edra

MASSON

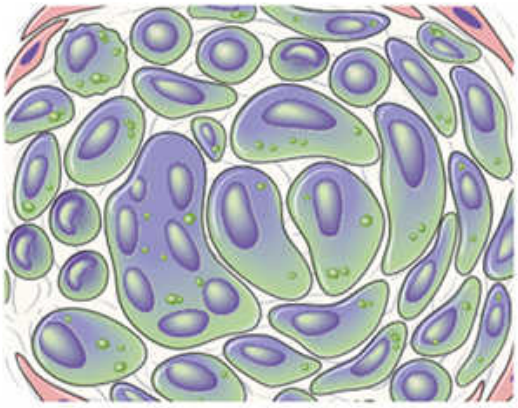
Abul K. Abbas
Andrew H. Lichtman
Shiv Pillai

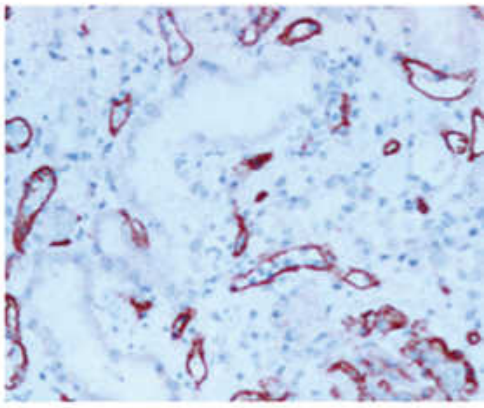
Immunologia cellulare e molecolare

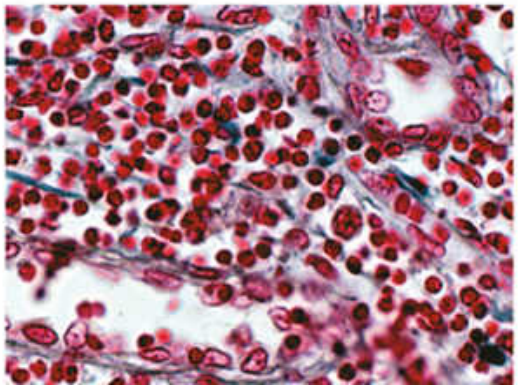
OTTAVA EDIZIONE

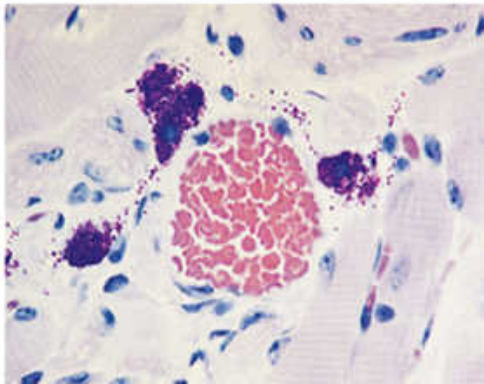
A cura di
Silvano Sozzani

Con la collaborazione di
Francesco Annunziato
Raffaele Badolato
Vincenzo Bronte
Domenico Caccavo
Mariella Chiricolo
Mario Clerici
Fabio Dall'Olio
Annalisa Del Prete
Francesco Dieli
Katia Fettucciari
Francesco Novelli
Nelly Maria Pellegrino
Paolo Puccetti
Luigina Romani
Emanuela Rosati
Marco Rusnati
Angela Santoni
Patrizia Scapini









Come vederli?

inserisci questo codice

AB158ED

seguendo le istruzioni a questo indirizzo

www.studenti33.it/abbas-immunologia

Contiene diversi contenuti online

Ecco quali

- Immagini del volume
- Test di autovalutazione

Potrai entrare a far parte della comunità di

Studenti33

Il nuovo portale EDRA per gli studenti universitari delle aree sanitarie con **notizie, approfondimenti, interviste e curiosità scientifiche** legate al mondo della salute.

Potrai accedere a

Codifa

Codifa.it, il motore di ricerca di tutti i prodotti della salute, farmaci e non solo. È il sistema informativo evoluto che medici e farmacisti utilizzano quotidianamente.

Immunologia cellulare e molecolare

Abul K. Abbas, MBBS
Distinguished Professor in Pathology
Chair, Department of Pathology
University of California San Francisco
San Francisco, California

Andrew H. Lichtman, MD, PhD
Professor of Pathology
Harvard Medical School
Brigham and Women's Hospital
Boston, Massachusetts

Shiv Pillai, MBBS, PhD
Professor of Medicine and Health Sciences and Technology
Harvard Medical School
Massachusetts General Hospital
Boston, Massachusetts

Immunologia cellulare e molecolare

OTTAVA EDIZIONE

A cura di
Silvano Sozzani

Con la collaborazione di

Francesco Annunziato
Raffaele Badolato
Vincenzo Bronte
Domenico Caccavo
Mariella Chiricolo
Mario Clerici
Fabio Dall'Olio
Annalisa Del Prete
Francesco Dieli
Katia Fettucciari
Francesco Novelli
Nelly Maria Pellegrino
Paolo Puccetti
Luigina Romani
Emanuela Rosati
Marco Rusnati
Angela Santoni
Patrizia Scapini

Illustrazioni di

David L. Baker, MA
Alexandra Baker, MS, CMI
DNA Illustrations, Inc.

edra
MASSON

Titolo originale dell'opera
Cellular and Molecular Immunology – Eighth Edition
© 2015, 2012, 2007, 2005, 2003, 2000, 1997, 1994, 1991, by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.
All rights reserved.

ISBN 978-0-323-22275-4

This translation is published by arrangement with Elsevier.

Traduzione dalla lingua inglese, per conto di Edra S.p.A., a cura di:
Chiara Barattieri di San Pietro, Alessandra Bocco, Marta Castano, Eleonora Servalli

Responsabile Editoriale Libri: Costanza Smeraldi
Editor Libri: Michela del Zoppo

Responsabile Redazione Libri: Paola Sammaritano
Project Manager Libri: Chiara Cucinella

Responsabile Produzione Libri: Michele Ribatti

Redazione e impaginazione: Alter Edom S.r.l., Noventa Padovana (PD)

Copertina: Paolo Ballerini

© 2015 Edra S.p.A.* – Tutti i diritti riservati
2008 – Sesta edizione (Elsevier Masson S.r.l.)
2009 – Ristampa (Elsevier S.r.l.)
2010 – Sesta edizione aggiornata (Elsevier S.r.l.)
2011 – Ristampa (Elsevier S.r.l.)
2012 – Ristampa (Elsevier S.r.l.)
2012 – Settima edizione (Elsevier S.r.l.)
2013 – Ristampa (LSWR S.r.l.)
2014 – Ristampa (EDRA LSWR S.p.A.)
2015 – Ristampa (EDRA LSWR S.p.A.)
2015 – Ottava edizione

ISBN 978-88-214-3962-9
eISBN 978-88-214-3963-6

I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica, di riproduzione e adattamento totale o parziale, con qualsiasi mezzo (compresi i microfilm e le copie fotostatiche), sono riservati per tutti i Paesi. Le fotocopie per uso personale del lettore possono essere effettuate nei limiti del 15% di ciascun volume dietro pagamento alla SIAE del compenso previsto dall'art. 68, commi 4 e 5, della legge 22 aprile 1941 n. 633.
Le fotocopie effettuate per finalità di carattere professionale, economico o commerciale o comunque per uso diverso da quello personale possono essere effettuate a seguito di specifica autorizzazione rilasciata da CLEARedi, Centro Licenze e Autorizzazioni per le Riproduzioni Editoriali, Corso di Porta Romana 108, 20122 Milano, e-mail autorizzazioni@clearedi.org e sito web www.clearedi.org.

La medicina è una scienza in continua evoluzione. La ricerca e l'esperienza clinica ampliano costantemente le nostre conoscenze, soprattutto in relazione alle modalità terapeutiche e alla farmacologia. Qualora il testo faccia riferimento al dosaggio o alla posologia di farmaci, il lettore può essere certo che autori, curatori ed editore hanno fatto il possibile per garantire che tali riferimenti siano conformi allo stato delle conoscenze al momento della pubblicazione del libro. Tuttavia, si consiglia il lettore di leggere attentamente i foglietti illustrativi dei farmaci per verificare personalmente se i dosaggi raccomandati o le controindicazioni specificate differiscano da quanto indicato nel testo. Ciò è particolarmente importante nel caso di farmaci usati raramente o immessi di recente sul mercato.

Edra S.p.A.
Via G. Spadolini 7, 20141 Milano
Tel. 02 881841
www.edizioniedra.it

(*) Edra S.p.A. fa parte di LSWR GROUP

Hanno collaborato all’edizione italiana

Silvano Sozzani
Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale
Università degli Studi di Brescia

Francesco Annunziato
Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica
Università degli Studi di Firenze

Raffaele Badolato
Dipartimento di Scienze Cliniche e Sperimentali
Università degli Studi di Brescia

Vincenzo Bronte
Dipartimento di Medicina
Università degli Studi di Verona

Domenico Caccavo
Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana
Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”

Mariella Chiricolo
Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale
Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

Mario Clerici
Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti
Università degli Studi di Milano

Fabio Dall’Olio
Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale
Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

Annalisa Del Prete
Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale
Università degli Studi di Brescia

Francesco Dieli
Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologie Mediche
Università degli Studi di Palermo

Katia Fettucciari
Dipartimento di Medicina Sperimentale
Università degli Studi di Perugia

Francesco Novelli
Dipartimento di Biotecnologie Molecolari e Scienze per la Salute
Università degli Studi di Torino

Nelly Maria Pellegrino
Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana
Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”

Paolo Puccetti
Dipartimento di Medicina Sperimentale
Università degli Studi di Perugia

Luigina Romani
Dipartimento di Medicina Sperimentale
Università degli Studi di Perugia

Emanuela Rosati
Dipartimento di Medicina Sperimentale
Università degli Studi di Perugia

Marco Rusnati
Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale
Università degli Studi di Brescia

Angela Santoni
Dipartimento di Medicina Molecolare
Sapienza – Università di Roma

Patrizia Scapini
Dipartimento di Medicina
Università degli Studi di Verona

Presentazione dell’edizione italiana

L’ottava edizione di *Immunologia cellulare e molecolare* propone un testo attentamente rivisto, aggiornato con le più recenti acquisizioni relative ai meccanismi che regolano le risposte immunitarie. In particolare, in questa edizione viene approfondito l’esame della connessione sempre più frequente tra ricerca di base e clinica.

Gli aggiornamenti contenuti nel volume riguardano aspetti sia dell’immunità innata sia di quella specifica. Viene ad esempio sviscerato il ruolo delle cellule linfoidi innate, una famiglia di cellule recentemente caratterizzate, coinvolte nella patogenesi di diverse malattie autoimmuni grazie alla loro capacità di mimare funzionalmente i vari stati di polarizzazione dei linfociti T helper.

Nell’ambito dell’immunità specifica, invece, un particolare accento è stato posto sul concetto dei “checkpoint” immunologici. La regolazione del sistema immunitario è infatti complessa e comprende molteplici modalità di realizzazione. Esistono tuttavia alcuni “snodi” (o “checkpoint”, appunto) che svolgono un ruolo più significativo di altri. L’importanza dell’identificazione dei checkpoint consiste nel fatto che alcuni di essi sono diventati il bersaglio di nuove strategie farmacologiche, soprattutto in campo oncologico.

A tal proposito è interessante notare che questa edizione dell’Abbas sta andando in stampa all’indomani dell’assegnazione del Lasker-DeBakey Clinical Medical Research Award a James P. Allison, lo scienziato che per primo ha identificato l’importanza di sviluppare farmaci diretti contro i checkpoint immunologici. All’inizio degli anni Novanta del secolo scorso, James P. Allison scoprì infatti il ruolo di una proteina, nota con il nome di CTLA-4, nel controllo negativo delle risposte immunitarie. Negli ultimi cinque anni le strategie terapeutiche dirette contro CTLA-4 e PD-1, una proteina funzionalmente analoga, hanno dimostrato una notevole efficacia contro alcuni tipi di tumori stimolando così un nuovo impulso

all’immunoterapia dei tumori. L’importanza dell’assegnazione del premio Laskar non sta solo nel prestigio di questo premio, ma nel fatto che nei settant’anni di vita del premio ben 86 tra i vincitori hanno successivamente ottenuto il riconoscimento del premio Nobel.

Viviamo in un’epoca in cui non solo la ricerca scientifica ha subìto una notevole accelerazione grazie al rapido sviluppo tecnologico, ma un numero sempre maggiore dei suoi risultati approda “al letto del paziente”. Ciò dimostra quanto la ricerca rappresenti un importante investimento per il futuro.

Questa fase stimolante e incredibilmente “rivoluzionaria” dell’immunologia è ben rappresentata nell’ottava edizione italiana del testo di Abul K. Abbas, che costituisce un importante strumento per entrare in contatto con i concetti più avanzati dell’immunologia. Studenti, specializzandi, cultori della materia e studiosi di discipline affini troveranno in esso una guida che, con grande semplicità ma al tempo stesso con accuratezza, potrà condurli lungo l’affascinante sentiero dell’immunologia moderna.

SILVANO SOZZANI

Prefazione

L'ottava edizione di *Immunologia cellulare e molecolare* è stata rivista e aggiornata secondo i recenti progressi scientifici, mantenendo al tempo stesso lo stile chiaro e comprensibile delle passate edizioni. Abbiamo aggiunto nuove informazioni, ponendo particolare enfasi su alcuni importanti concetti, senza però accrescere le dimensioni del volume. Inoltre, abbiamo modificato molte sezioni del testo per migliorarne la chiarezza, l'accuratezza e la completezza.

Tra i principali cambiamenti apportati, la riorganizzazione dei capitoli relativi alle risposte dei linfociti T, finalizzata a fornire una descrizione più chiara degli eventi correlati alla precoce attivazione delle cellule T, alla differenziazione e alle funzioni dei sottogruppi di cellule T helper $CD4^+$ e alle funzioni dei linfociti T citotossici $CD8^+$. Oltre a ciò, l'intero volume è stato aggiornato al fine di includere i numerosi progressi nel campo dell'immunologia. Alcuni degli argomenti che abbiamo sottoposto a profonda revisione sono le cellule linfoidi innate, le vie di segnalazione di sviluppo dei macrofagi e delle cellule dendritiche e i checkpoint immunitari nell'immunità contro i tumori. Riteniamo importante e stupefacente che dall'analisi dei complessi sistemi che sottostanno alle risposte immunitarie emergano di continuo nuovi principi. Forse una delle prospettive più interessanti per gli studenti di medicina è che i principi fondamentali dell'immunologia costituiscano oggi le fondamenta per lo sviluppo razionale di nuove terapie immunologiche. In tutto il volume abbiamo cercato di mettere in risalto questi nuovi approcci terapeutici e i principi su cui si basano.

Abbiamo inoltre rivisto l'iconografia, aggiungendo nuove illustrazioni e modificando quelle esistenti nell'ottica di una maggiore accuratezza e chiarezza. Abbiamo mantenuto scelte stilistiche quali l'uso del grassetto e del corsivo per evidenziare i concetti essenziali e rendere più scorrevole la lettura. Le Letture consigliate rinviano agli articoli più recenti su un dato

argomento e forniscono una trattazione approfondita di temi specifici per i lettori interessati. Abbiamo suddiviso le Letture consigliate in sezioni tematiche per aiutare gli studenti a individuare gli articoli più utili alle loro esigenze.

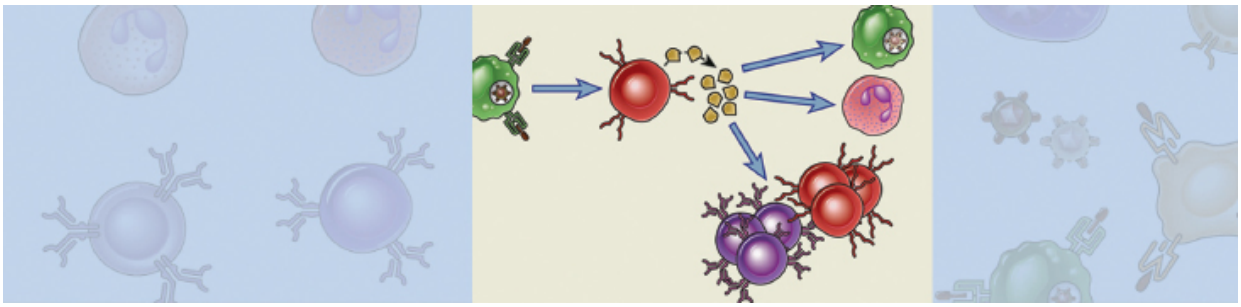
Tra le persone che hanno contributo alla realizzazione del presente volume, fornendo utili spunti e preziosi commenti su argomenti specifici, figurano (in ordine alfabetico): Jonathan Abbas, Mark Anderson, Homer Boushey, Andrew Gross, Stephen Hauser, Miriam Merad, Michael Rosenblum, Wayne Shreffler e Catherine Wu. Ringraziamo Hiroshi Kawamoto per la grafica della copertina e i nostri illustratori, David e Alexandra Baker di DNA Illustrations, per i loro suggerimenti. Numerosi membri dello staff Elsevier hanno svolto un ruolo fondamentale. Il nostro editor, James Merritt, ci ha dato sostegno e incoraggiamento. Il nostro responsabile editoriale, Rebecca Gruliow, ha accompagnato il libro in tutte le fasi della lavorazione fino alla sua effettiva produzione. Lou Forgione si è occupato del progetto grafico, mentre Clay Broeker ha gestito la fase di produzione. Siamo inoltre grati alle nostre famiglie per il loro supporto incondizionato e per aver tollerato le nostre assenze. Grazie, infine, ai nostri studenti, che sono stati gli ispiratori originari della prima edizione, perché è grazie a loro che impariamo a pensare alla scienza dell’immunologia e a comunicarne la conoscenza nel modo più chiaro ed efficace.

ABUL K. ABBAS
ANDREW H. LICHTMAN
SHIV PILLAI

Ai nostri studenti, ai nostri colleghi e alle nostre famiglie

CAPITOLO

1



Caratteristiche generali delle risposte immunitarie

IMMUNITÀ INNATA E ADATTATIVA
TIPI DI RISPOSTE IMMUNITARIE ADATTATIVE
CARATTERISTICHE SALIENTI DELLE RISPOSTE IMMUNITARIE ADATTATIVE
COMPONENTI CELLULARI DEL SISTEMA IMMUNITARIO ADATTATIVO
INTRODUZIONE ALL'IMMUNITÀ ANTIMICROBICA
Risposte dell'immunità innata
Risposte dell'immunità adattativa
RIEPILOGO

Il termine *immunità* deriva dal latino *immunitas*, che si riferisce alla protezione dalla perseguibilità legale di cui godevano i senatori romani in carica. Storicamente, immunità significa protezione dalla malattia e, più specificamente, dalla malattia infettiva. Le cellule e le molecole responsabili dell'immunità costituiscono il **sistema immunitario** e la loro risposta coordinata verso le sostanze estranee è chiamata **risposta immunitaria**.

La funzione fisiologica del sistema immunitario è la difesa da agenti infettivi. Possono tuttavia suscitare una risposta immunitaria anche sostanze estranee di natura non infettiva. Inoltre, i meccanismi che normalmente proteggono dall'infezione ed eliminano le sostanze estranee possono, in alcune circostanze, causare danno tissutale e malattia. Quindi, per dare una definizione più completa di immunità si potrebbe dire che è la risposta a componenti microbiche e a macromolecole, come proteine e polisaccaridi, indipendentemente dalle conseguenze fisiologiche o patologiche di tale risposta. In alcune situazioni, anche le molecole self possono attivare una risposta immunitaria (chiamata risposta autoimmune). L'immunologia è lo studio delle risposte immunitarie in questa accezione più ampia e degli eventi cellulari e molecolari che si verificano quando un organismo incontra microbi e altre macromolecole estranee.

Gli storici sovente accreditano Tucidide, nell'Atene del V secolo a.C., come il primo a menzionare l'immunità verso un'infezione, da lui denominata "peste" (ma che verosimilmente non era la peste bubbonica conosciuta oggi). Probabilmente, il concetto di immunità esiste da molto prima, come suggerito dall'antica usanza cinese di rendere i bambini resistenti al vaiolo facendo loro inalare talco ottenuto da lesioni cutanee di

pazienti guariti dalla malattia. L'immunologia, nella sua forma moderna, è una scienza sperimentale, in cui l'interpretazione dei fenomeni si basa su osservazioni sperimentali e sulle conclusioni scaturite da esse. L'evoluzione dell'immunologia in disciplina sperimentale è dipesa dalla nostra capacità di manipolare le funzioni del sistema immunitario in condizioni controllate. Storicamente, il primo chiaro esempio di tale manipolazione, che rimane fra i più affascinanti mai registrati, fu il successo di Edward Jenner nella vaccinazione contro il vaiolo. Jenner, un medico inglese, notò che le mungitrici guarite dal vaiolo bovino non contraevano mai la ben più grave forma di vaiolo umano. Sulla base di questa osservazione, egli iniettò materiale estratto da una pustola di vaiolo bovino nel braccio di un ragazzo di 8 anni. Quando, in seguito, questo ragazzo fu intenzionalmente inoculato con il vaiolo, la malattia non si sviluppò. Il fondamentale trattato di Jenner sulla **vaccinazione** (dal latino *vaccinus*) fu pubblicato nel 1798. Esso portò alla diffusa accettazione di questo metodo per indurre immunità verso le malattie infettive e la vaccinazione rimane la procedura più efficace per prevenire le infezioni (Tab. 1-1). Un'eloquente testimonianza dell'importanza dell'immunologia è stato l'annuncio dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, dato nel 1980, che il vaiolo era la prima malattia eradicata in tutto il mondo grazie a un programma di vaccinazione.

TABELLA 1-1 Efficacia della vaccinazione per alcune comuni malattie infettive

Patologia	Numero massimo di casi (anno)	Numero di casi nel 2009	Variazione percentuale
Difterite	206.939 (1921)	0	−99,99
Morbillo	894.134 (1941)	61	−99,99
Parotite	152.209 (1968)	982	−99,35
Pertosse	265.269 (1934)	13.506	−94,72
Poliomielite (paralitica)	21.269 (1952)	0	−100,0
Rosolia	57.686 (1969)	4	−99,99
Tetano	1.560 (1923)	14	−99,10
Infezione da *Haemophilus influenzae* tipo B	~20.000 (1984)	25	−99,88
Epatite B	26.611 (1985)	3.020	−87,66

La tabella illustra l'impressionante diminuzione negli Stati Uniti dell'incidenza di alcune malattie infettive per le quali sono stati sviluppati vaccini efficaci.

(*Adattata da Orenstein WA, Hinman AR, Bart KJ, Hadler SC: Immunization. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R [eds.]: Principles and Practices of Infectious Diseases, 4th ed. New York, 1995, Churchill Livingstone; e Morbidity and Mortality Weekly Report 58:1458–1469, 2010.*)

A partire dagli anni Sessanta, vi è stato un notevole aumento della conoscenza del sistema immunitario e delle sue funzioni. I progressi nelle tecniche di coltura cellulare (inclusa la produzione di anticorpi monoclonali), l'immunochimica, la tecnologia del DNA ricombinante, la cristallografia a raggi X e la produzione di animali geneticamente modificati (in particolare topi transgenici e topi knockout) hanno trasformato l'immunologia da una scienza in gran parte descrittiva a una scienza che spiega i diversi fenomeni immunitari con parametri strutturali e biochimici. In questo capitolo saranno illustrate le caratteristiche generali delle risposte immunitarie e verranno introdotti i concetti fondamentali della moderna immunologia che verranno richiamati in tutto il testo.

IMMUNITÀ INNATA E ADATTATIVA

La difesa contro i microbi è assicurata dalle reazioni precoci dell'immunità innata e da quelle più tardive dell'immunità adattativa (Fig. 1-1 e Tab. 1-2). L'**immunità innata** (detta anche **naturale** o **nativa**) consiste in meccanismi di difesa cellulare e biochimici preesistenti all'infezione e pronti a reagire con rapidità. Questi meccanismi rispondono ai prodotti dei microbi e alle cellule danneggiate e reagiscono sostanzialmente in modo identico alle ripetute esposizioni. I meccanismi dell'immunità innata riconoscono strutture comuni a gruppi di microbi correlati e possono non distinguere differenze sottili tra i microbi. I principali componenti dell'immunità innata sono 1) le barriere fisiche e chimiche, come gli epiteli e le sostanze antimicrobiche prodotte dalle superfici epiteliali; 2) le cellule fagocitiche (neutrofili e macrofagi), le cellule dendritiche e le cellule natural killer (NK) e altre cellule linfoidi innate; 3) le proteine del sangue, tra cui i fattori del sistema del complemento e altri mediatori della flogosi

TABELLA 1-2 Aspetti dell'immunità innata e adattativa

	Innata	Adattativa

Caratteristiche		
Specificità	Per molecole condivise da microbi di uno stesso gruppo e molecole prodotte da cellule ospiti danneggiate	Per antigeni microbici e per antigeni non microbici
Diversificazione	Limitata; codificata nella linea germinativa	Molto ampia; i recettori sono prodotti per ricombinazione somatica di segmenti genici
Memoria	Nessuna	Sì
Non reattività al self	Sì	Sì
Componenti		
Barriere cellulari e chimiche	Cute, epiteli delle mucose; sostanze antimicrobiche	Linfociti intraepiteliali; anticorpi secreti a livello delle superfici epiteliali
Proteine ematiche	Complemento, altre	Anticorpi
Cellule	Fagociti (macrofagi, neutrofili), cellule natural killer, cellule linfoidi innate	Linfociti

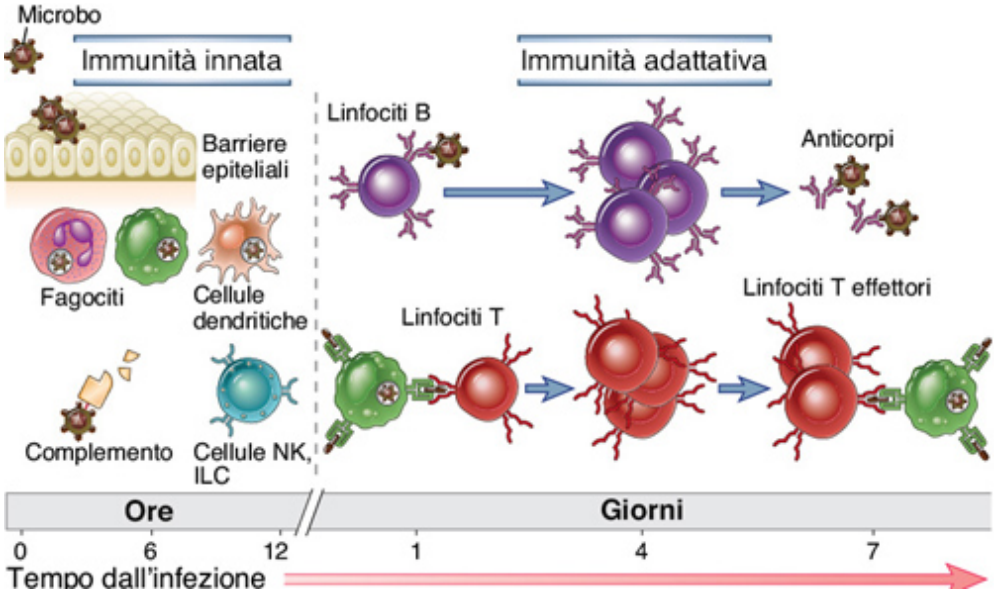


FIGURA 1-1 Immunità innata e adattativa. I meccanismi dell'immunità innata forniscono le difese iniziali contro le infezioni. Le risposte adattative si sviluppano successivamente e richiedono l'attivazione dei linfociti. La cinetica delle risposte innate e adattative è rappresentata in modo approssimativo e può variare a seconda del tipo di infezione. ILC, cellula linfoide innata; NK, cellula natural killer.

A fianco dell'immunità innata esistono altre risposte immunitarie che aumentano in ampiezza e capacità difensive a ogni successiva esposizione a

un particolare agente infettivo. Questa forma di immunità – detta anche immunità **specifica** o **acquisita** – viene definita **adattativa**, poiché si sviluppa e si adatta in risposta all'infezione stessa. Il sistema immunitario adattativo è in grado di riconoscere un elevato numero di sostanze, microbiche e non, e di reagire in risposta a esse. Le caratteristiche che definiscono l'immunità adattativa sono la capacità di distinguere le diverse sostanze, detta **specificità**, e la capacità di rispondere con maggiore vigore a esposizioni ripetute a uno stesso microbo, nota come **memoria**. I principali componenti dell'immunità adattativa sono cellule chiamate **linfociti** e i loro prodotti di secrezione, come gli **anticorpi**. Le sostanze estranee che inducono una risposta immunitaria specifica o che sono riconosciute da linfociti e anticorpi vengono dette **antigeni**.

Le **citochine** sono un'ampia classe di proteine secrete che possiedono strutture e funzioni diverse, deputate alla regolazione e al coordinamento di numerose attività delle cellule dell'immunità innata e adattativa. Tutte le cellule del sistema immunitario secernono almeno alcune citochine ed esprimono specifici recettori che trasducono i segnali di attivazione delle citochine. La nomenclatura delle citochine è discordante: mentre alcune sono definite come *interleuchina* seguita da un numero, altre sono classificate in base all'attività biologica inizialmente a loro attribuita, come nel caso del fattore di necrosi tumorale (*Tumor Necrosis Factor*, TNF) o dell'interferone. Tra le diverse funzioni delle citochine che tratteremo in questo volume vi sono la crescita e la differenziazione di tutte le cellule del sistema immunitario, l'attivazione delle funzioni effettrici dei linfociti e dei fagociti e la loro migrazione dal sangue ai tessuti. L'ampio gruppo di citochine strutturalmente omologhe che regolano la migrazione e il movimento cellulare prende il nome di **chemochine**. Alcuni dei farmaci di nuova generazione più efficaci nel trattamento delle malattie del sistema immunitario hanno come bersaglio le citochine, il che dimostra l'importanza di queste proteine nelle risposte immunitarie.

I meccanismi di difesa dell'ospite contro i microbi sono presenti in tutti gli organismi multicellulari. I più antichi dal punto di vista filogenetico sono quelli relativi all'immunità innata, che sono presenti anche nelle piante e negli insetti. Circa 500 milioni di anni fa, pesci privi di apparato mandibolare (ostracodermi), come le lamprede e le mixine, svilupparono un peculiare sistema immunitario il quale comprendeva tipi cellulari che

funzionavano in modo simile ai linfociti nelle specie più evolute, rispondendo persino all'immunizzazione. I recettori per l'antigene presenti su queste cellule sono recettori ricchi di leucina costituiti da regioni variabili in grado di riconoscere diversi tipi di antigeni, questi recettori sono tuttavia diversi dagli anticorpi e dai recettori dei linfociti T che comparvero in fasi successive dell'evoluzione. La maggior parte dei componenti dell'immunità adattativa, tra cui i linfociti con i loro recettori altamente diversificati, gli anticorpi e i tessuti linfoidi specializzati, si sono invece evoluti nei vertebrati dotati di apparato mandibolare (per esempio gli squali) nell'arco di un periodo limitato, circa 360 milioni di anni fa.

La risposta immunitaria innata e quella adattativa sono parte di un sistema integrato di meccanismi di difesa a cui cooperano numerose cellule e molecole. I meccanismi dell'immunità innata forniscono una difesa efficace contro le infezioni. Molti agenti patogeni tuttavia si sono evoluti per resistere all'immunità innata e la loro eliminazione richiede l'intervento dei potenti meccanismi dell'immunità adattativa. Vi sono numerose connessioni tra immunità innata e adattativa. L'immunità innata ai microbi stimola e condiziona la natura della risposta immunitaria adattativa. Inoltre, le risposte immunitarie adattative funzionano spesso potenziando i meccanismi effettori dell'immunità innata, rendendoli più efficaci nel combattere i microbi.

TIPI DI RISPOSTE IMMUNITARIE ADATTATIVE

Esistono due tipi di risposte adattative, chiamati immunità umorale e immunità cellulare; essi sono mediati da componenti diverse del sistema immunitario e hanno il compito di eliminare tipi diversi di microbi (Fig. 1-2). L'**immunità umorale** è mediata da molecole presenti nel sangue e nelle secrezioni mucosali, chiamate **anticorpi**, che sono prodotti da cellule denominate **linfociti B** (detti anche **cellule B**). Gli anticorpi riconoscono gli antigeni microbici neutralizzandone l'infettività e identificandoli per la successiva eliminazione da parte di vari meccanismi effettori. L'immunità umorale costituisce il principale meccanismo di difesa contro i microbi extracellulari e le loro tossine, poiché gli anticorpi secreti possono legarsi

agevolandone l'eliminazione. Gli anticorpi possiedono diversi gradi di specializzazione e, a seconda del tipo, possono attivare differenti meccanismi per combattere i microbi (**meccanismi effettori**). Per esempio, diversi tipi di anticorpi promuovono l'ingestione dei microrganismi da parte delle cellule dell'ospite (fagocitosi), si legano e scatenano il rilascio dei mediatori della flogosi da parte di alcuni leucociti o sono attivamente trasportati nel lume mucosale di molti organi e attraverso la placenta, per fornire una difesa nei confronti di microbi inalati, ingeriti e per proteggere il neonato. I **linfociti T** (detti anche **cellule T**) sono responsabili dell'**immunità cellulo-mediata** (chiamata anche **immunità cellulare**). I microbi intracellulari, come i virus e alcuni batteri, sopravvivono e proliferano all'interno dei fagociti e di altri tipi cellulari, e diventano inaccessibili agli anticorpi circolanti. La difesa contro tali infezioni dipende dall'immunità cellulare, che elimina i serbatoi di infezione attraverso l'eliminazione dei microbi residenti nei fagociti e l'uccisione delle cellule infettate. Alcuni linfociti T contribuiscono inoltre all'eradicazione dei microbi extracellulari reclutando altri tipi di leucociti in grado di eliminare questi patogeni e di aiutare i linfociti B a produrre anticorpi efficaci.

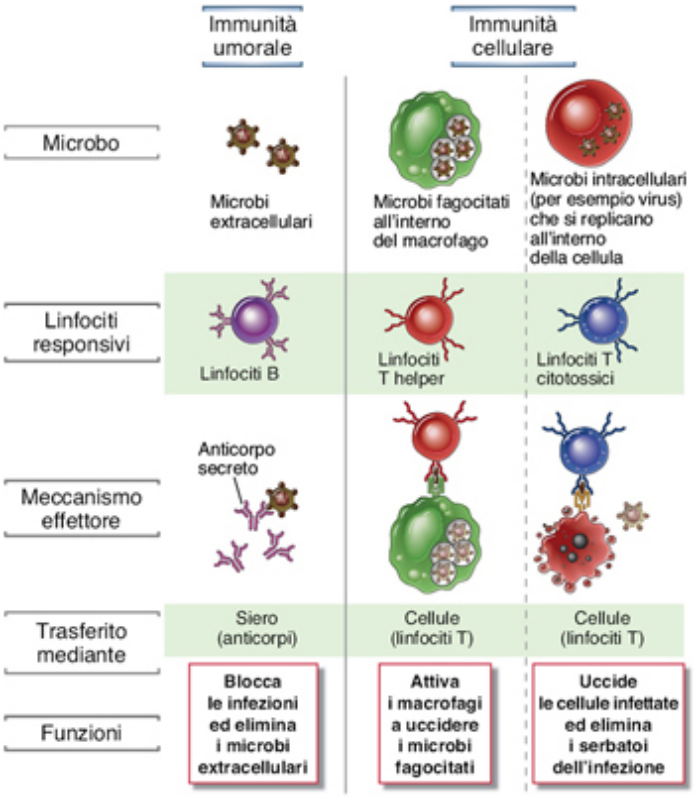


FIGURA 1-2 Tipi di immunità adattativa. Nell'immunità umorale, i linfociti B secernono anticorpi che prevengono le infezioni ed eliminano i microbi extracellulari. Nell'immunità cellulare, i linfociti T helper attivano i macrofagi a uccidere microbi fagocitati o, in alternativa, i CTL uccidono direttamente le cellule infettate.

La protezione immunologica verso un microbo deriva solitamente dalla risposta dell'ospite (Fig. 1-3). L'immunità che deriva dall'esposizione a un antigene è detta **immunità attiva** poiché l'individuo immunizzato ha un ruolo attivo nella risposta all'antigene. Individui e linfociti che non hanno incontrato un particolare antigene sono detti *naïve*. I soggetti che hanno risposto a un antigene microbico e sono protetti dalla successiva esposizione allo stesso microbo sono detti immuni.

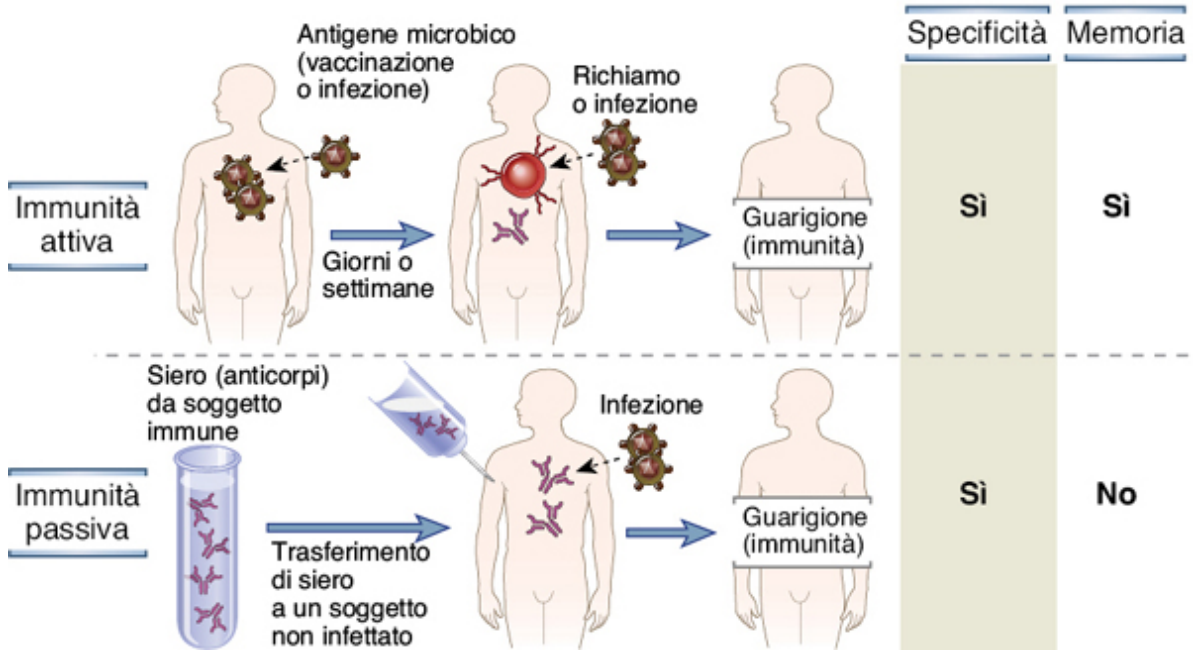


FIGURA 1-3 Immunità attiva e passiva. L'immunità attiva a un microbo o a un antigene microbico deriva dalla risposta dell'ospite, mentre l'immunità passiva è la conseguenza del trasferimento di anticorpi o di linfociti T specifici per il microbo. Entrambe le forme di immunità forniscono resistenza alle infezioni e sono specifiche per gli antigeni microbici, ma solo le risposte immunitarie attive generano memoria immunologica. Nell'uomo, il trasferimento passivo di anticorpi a scopo terapeutico, ma non di linfociti, si esegue di routine e inoltre ha luogo in gravidanza (dalla madre al feto).

L'immunità può essere inoltre conferita a un individuo in contesti sperimentali mediante il trasferimento di siero o di linfociti da un soggetto vaccinato. Questo processo è noto come trasferimento adottivo (vedi Fig. 1-3). Il ricevente diventa immune a quel particolare antigene senza mai essere

stato esposto o avere risposto a esso. Pertanto, questa forma di immunità viene definita **immunità passiva**. L'immunizzazione passiva è un sistema utile per conferire rapidamente resistenza, senza aspettare che si sviluppi una risposta attiva. Un esempio importante e fisiologico di immunità passiva è il trasferimento degli anticorpi materni al feto attraverso la placenta, che consente ai neonati di combattere le infezioni ancor prima di acquisire la capacità di produrre anticorpi. L'immunizzazione passiva contro tossine batteriche, attraverso la somministrazione di anticorpi da animali immunizzati, è una terapia salvavita nei confronti di infezioni potenzialmente letali, come la rabbia e il morso di serpenti. La tecnica del trasferimento adottivo ha anche permesso di identificare le cellule e le molecole responsabili dell'immunità specifica. Di fatto, l'immunità umorale fu originariamente definita come il tipo di immunità che può essere trasferita ai soggetti non immunizzati, o naïve, attraverso frazioni ematiche acellulari (cioè, plasma o siero) contenenti anticorpi prelevati da soggetti immunizzati. Analogamente, l'immunità cellulare venne definita come il tipo di immunità che può essere trasferita ad animali naïve attraverso linfociti (cellule T) ottenuti da animali vaccinati, ma non con plasma o siero.

Nel 1890, Emil von Behring e Shibasaburo Kitasato fornirono le prime dimostrazioni sperimentali dell'immunità umorale. Questi ricercatori dimostrarono che era possibile rendere animali naïve immuni con una forma attenuata della tossina difterica. I componenti attivi del siero furono chiamati antitossine perché neutralizzavano gli effetti patologici della tossina difterica. Questo risultato portò all'utilizzo di antitossine per il trattamento dell'infezione difterica, sino a quel momento letale, e la sua importanza fu riconosciuta attraverso l'assegnazione del primo premio Nobel per la Fisiologia e la Medicina a von Behring. Negli anni '90 del diciannovesimo secolo, Paul Ehrilch propose che le cellule del sistema immunitario usassero dei recettori, che lui chiamò catene laterali, per riconoscere le tossine microbiche e che successivamente tali recettori venissero rilasciati dalla cellula per combattere i microbi. Egli coniò anche il termine *anticorpi* (*Antikörper* in tedesco) per definire le proteine sieriche che legano le tossine, le sostanze che causavano la produzione degli anticorpi furono invece chiamate *antigeni*. La moderna definizione di antigene si applica a tutti i composti che legano i recettori specifici dei linfociti, indipendentemente dalla loro capacità di stimolare il sistema immunitario. In base a queste

definizioni, le sostanze che stimolano le risposte immunologiche sono definite **immunogene**, anche se questo termine viene spesso sostituito con il termine antigene. Le caratteristiche degli anticorpi e degli antigeni saranno descritte nel Capitolo 5. I concetti proposti da Ehrlich rappresentano un perspicace modello delle funzioni dei linfociti B e dell'immunità umorale. Questa iniziale attenzione agli anticorpi portò all'accettazione della teoria umorale dell'immunità, secondo la quale l'immunità è mediata da sostanze presenti nei fluidi corporei (a quel tempo chiamati umori).

Elie Metchnikoff inizialmente difese la teoria dell'immunità cellulare, che sostiene la centralità del ruolo svolto dalle cellule nella risposta immunitaria dell'ospite. La sua descrizione dei fagociti che circondano una spina infissa in una larva di stella di mare semitrasparente, pubblicata nel 1883, fu forse la prima evidenza sperimentale che le cellule rispondono agli invasori. Erlich e Metchnikoff condivisero il premio Nobel nel 1908, un riconoscimento dei loro contributi per la definizione di questi due principi fondamentali dell'immunologia. All'inizio del Novecento, Sir Almroth Wright osservò che fattori presenti nel siero immune rivestivano il batterio e ne potenziavano la fagocitosi, processo oggi noto come **opsonizzazione**. Questa osservazione supportò la convinzione che gli anticorpi preparino i microbi all'ingestione da parte dei fagociti. Questi primi fautori della teoria cellulare non furono tuttavia in grado di provare che le cellule sono effettivamente responsabili dell'immunità specifica nei confronti dei microbi. La teoria dell'immunità cellulare fu definitivamente accettata negli anni Cinquanta, quando venne dimostrato che la resistenza a un batterio intracellulare, il *Listeria monocytogenes*, poteva essere conferita mediante il trasferimento sperimentale di cellule ma non di siero. Oggi sappiamo che la specificità dell'immunità cellulare è dovuta ai linfociti che eliminano i microbi operando in concerto con altre cellule, come quelle fagocitiche.

In ambito clinico, l'immunità a un microbo viene indirettamente misurata sia dosando i prodotti delle risposte immunitarie (come gli anticorpi specifici per determinati antigeni) sia misurando la reazione alla somministrazione di sostanze purificate da microbi. Tale reazione è presente solo negli individui che hanno precedentemente incontrato l'antigene. La risposta rappresenta un segno che questi soggetti sono stati precedentemente "*sensibilizzati*" verso l'antigene e quindi sono *immuni*. La reazione a un antigene microbico

implica che i soggetti sensibilizzati siano in grado di scatenare una risposta immunitaria protettiva verso il microbo.

CARATTERISTICHE SALIENTI DELLE RISPOSTE IMMUNITARIE ADATTATIVE

Tutte le risposte immunitarie a un antigene estraneo, umorali e cellulari, possiedono alcune caratteristiche fondamentali che riflettono le proprietà dei linfociti responsabili di tali risposte (Tab. 1-3).

TABELLA 1-3 Caratteristiche salienti delle risposte immunitarie adattative

Caratteristica	Significato funzionale
Specificità	Assicura che la risposta immunitaria a un microbo (o a un antigene non microbico) sia specifica per quel microbo (o antigene)
Diversificazione	Rende il sistema immunitario in grado di rispondere a una grande varietà di antigeni
Memoria	Aumenta la capacità di combattere ripetute infezioni dovute allo stesso microbo
Espansione clonale	Aumenta il numero di linfociti specifici per l'antigene
Specializzazione	Genera risposte ottimali per la difesa contro distinti tipi di microbi
Risoluzione e omeostasi	Consente al sistema immunitario di riprendersi da una risposta in modo da poter rispondere efficacemente ai nuovi antigeni incontrati
Non reattività al self	Previene danni all'ospite durante le risposte agli antigeni estranei

- ***Specificità e diversificazione***. Le risposte immunitarie sono specifiche verso porzioni distinte di una singola proteina complessa, di un polisaccaride o di altre macromolecole (Fig. 1-4). Le porzioni degli antigeni, che sono riconosciute dai linfociti in modo specifico, sono chiamate **determinanti** o **epitopi**. Questa raffinata specificità esiste perché i singoli linfociti esprimono recettori di membrana in grado di discriminare le sottili differenze presenti nella struttura dei diversi antigeni. Nei soggetti non immunizzati sono presenti cloni linfocitari dotati di molteplici specificità, capaci di riconoscere antigeni diversi e di rispondervi. Questo concetto è alla base dell'ipotesi della selezione clonale, di cui parleremo più avanti in questo capitolo.

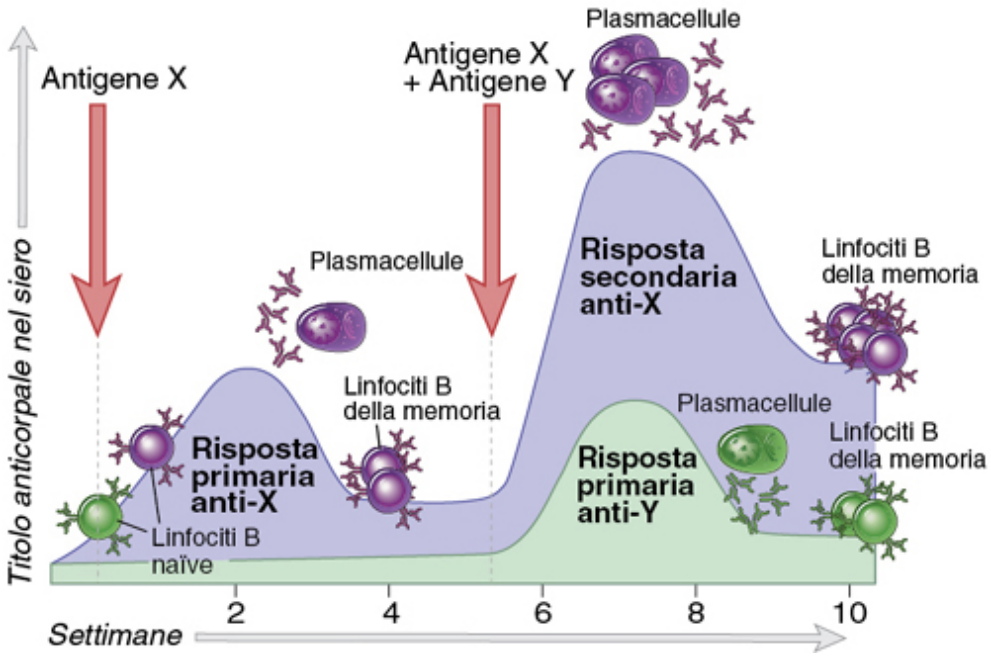


FIGURA 1-4 Specificità, memoria e risoluzione delle risposte immunitarie adattative. Antigeni X e Y inducono la produzione di anticorpi con specificità diversa. La risposta secondaria all'antigene X è più rapida e potente della risposta primaria (memoria). I livelli anticorpali si riducono successivamente a ogni immunizzazione (risoluzione, il processo che mantiene l'omeostasi). Le stesse caratteristiche si osservano nella risposta immunitaria cellulare.

I linfociti di un individuo possiedono la capacità di riconoscere un enorme numero di antigeni, definito repertorio linfocitario. Si calcola che il sistema immunitario sia in grado di discriminare tra 10^7 e 10^9 determinanti antigenici. Questa proprietà del repertorio linfocitario è definita **diversificazione** ed è il risultato della variabilità dei siti di legame dei recettori con l'antigene. In altre parole, vi sono molti cloni di linfociti che differiscono nella struttura dei loro recettori e quindi nella loro specificità verso gli antigeni. Questo genera un repertorio ampio e molto variegato. L'espressione di **diversi** recettori per l'antigene in diversi cloni linfocitari costituisce la ragione per cui i recettori dei linfociti T e B vengono considerati distribuiti in modo clonale. Nel Capitolo 8 sono discussi i meccanismi molecolari che generano questo repertorio recettoriale.

- ***Memoria***. L'esposizione del sistema immunitario a un antigene non self aumenta la sua futura capacità a rispondere a quell'antigene. Le risposte alla seconda e alle successive esposizioni allo stesso antigene, chiamate

risposte secondarie, sono in genere più rapide, più potenti e spesso qualitativamente diverse dalla risposta primaria (vedi Fig. 1-4). La memoria immunologica si basa sul fatto che a ogni esposizione antigenica si generano cellule a lunga sopravvivenza specifiche per quel dato antigene. Queste cellule sono più numerose dei rispettivi cloni di linfociti naïve, dotati della stessa specificità, che esistevano precedentemente all'esposizione all'antigene. Inoltre, le cellule della memoria possiedono particolari caratteristiche che le rendono più efficienti dei linfociti naïve nell'eliminazione dell'antigene. Per esempio, i linfociti B della memoria producono anticorpi che legano gli antigeni con un'affinità più elevata di quanto non facciano le cellule B naïve. In modo simile, i linfociti T della memoria rispondono più rapidamente ed efficientemente agli antigeni di quanto facciano i linfociti T naïve.

- ***Espansione clonale***. Quando i linfociti riconoscono l'antigene per cui sono specifici, vanno incontro a una forte proliferazione. Il termine *espansione clonale* si riferisce all'aumento del numero dei linfociti che esprimono un recettore identico per il medesimo antigene e quindi appartengono allo stesso clone. L'aumento del numero delle cellule specifiche per un determinato antigene permette all'immunità adattativa di fronteggiare il rapido aumento degli agenti patogeni.
- ***Specializzazione***. Come già notato in precedenza, il sistema immunitario risponde in modo differenziato a diversi tipi di microbi, sfruttando al meglio l'efficienza dei meccanismi di difesa. Ciò significa che le risposte umorali o cellulari sono attivate da classi diverse di microbi, oppure dallo stesso microbo in stadi diversi dell'infezione (extracellulare e intracellulare), e ciascun tipo di risposta protegge l'ospite in modo specifico nei confronti del microbo che l'ha generata. Anche nell'ambito delle risposte immunitarie umorali e cellulari, la natura degli anticorpi o dei linfociti T varia in base alla classe di microbi coinvolti. Ritorneremo sui meccanismi e sul significato funzionale di tale specializzazione nei prossimi capitoli.
- ***Risoluzione e omeostasi***. Normalmente, tutte le risposte immunitarie si esauriscono nel periodo successivo alla stimolazione antigenica, permettendo al sistema immunitario di tornare allo stato di riposo, una condizione definita **omeostasi** (vedi Fig. 1-4). La risoluzione della

risposta immunitaria è in genere dovuta all'eliminazione dell'antigene, che fa venire meno lo stimolo che ha determinato l'attivazione e la sopravvivenza dei linfociti. Tutti i linfociti, (esclusi quelli della memoria), una volta privati dell'opportuna stimolazione, vanno incontro a morte per apopotosi.

- ***Non reattività verso il self***. Una delle principali proprietà del sistema immunitario di un individuo sano è la capacità di riconoscere gli antigeni estranei all'organismo (non self), rispondervi ed eliminarli senza reagire pericolosamente agli antigeni propri dell'individuo (self). La non responsività immunologica è anche detta **tolleranza**. La tolleranza viene preservata grazie a molti meccanismi, come l'eliminazione dei linfociti che esprimono recettori specifici per antigeni self, l'inattivazione dei linfociti autoreattivi e l'azione di cellule soppressive. Le alterazioni nell'induzione o nel mantenimento della tolleranza determinano risposte contro gli antigeni self (antigeni autologhi) che possono sfociare in **patologie dette autoimmuni**. La tolleranza al self e il suo fallimento sono discussi nel Capitolo 15.

Queste caratteristiche dell'immunità adattativa sono necessarie affinché il sistema immunitario possa adempiere alla sua funzione fisiologica di difesa dell'ospite (vedi Tab. 1-3). La specificità e la memoria consentono di potenziare le risposte nei confronti di stimoli antigenici persistenti o ricorrenti, combattendo così infezioni prolungate o ricorrenti. La diversificazione è essenziale per fronteggiare i numerosi e potenziali patogeni ambientali. La specializzazione consente all'ospite di "modulare" le risposte per meglio combattere i diversi tipi di microbi. L'autolimitazione della risposta permette al sistema immunitario di tornare a uno stato di riposo dopo avere eliminato ogni antigene estraneo e di prepararsi alla risposta ad altri antigeni. La tolleranza al self è fondamentale per prevenire gravi reazioni contro cellule o tessuti autologhi, pur mantenendo un ampio repertorio di linfociti specifici per gli antigeni non self.

La risposta immunitaria è regolata da meccanismi di feedback positivo, deputati ad amplificare le reazioni, e da meccanismi che prevengono le risposte inappropriate o patologiche. I linfociti attivati innescano una serie di reazioni che amplificano l'entità della risposta. Questi meccanismi di feedback positivo sono importanti per permettere ai pochi linfociti dotati

della specificità utile di attivarsi e di eradicare l'infezione. In parallelo, vengono anche avviate strategie di controllo preposte a prevenire l'eccessiva attivazione dei linfociti, che potrebbe causare un danno ai tessuti circostanti, e a impedire la risposta nei confronti di antigeni self. La risposta immunitaria rappresenta quindi un delicato equilibrio tra segnali attivatori e inibitori. Nel corso di questo volume ritorneremo in modo più specifico su queste caratteristiche fondamentali del sistema immunitario.

COMPONENTI CELLULARI DEL SISTEMA IMMUNITARIO ADATTATIVO

Le principali cellule del sistema immunitario adattativo sono i linfociti, le cellule accessorie e le cellule effettrici. I linfociti sono le cellule che riconoscono e rispondono in modo specifico agli antigeni estranei e quindi rappresentano i mediatori dell'immunità umorale e cellulare. Esistono sottopopolazioni distinte di linfociti che differiscono per le modalità di riconoscimento dell'antigene e le funzioni effettrici (Fig. 1-5). I **linfociti B** sono le sole cellule in grado di produrre anticorpi; essi riconoscono gli antigeni extracellulari solubili e quelli presenti sulla superficie cellulare, e si differenziano in cellule secernenti anticorpi, svolgendo pertanto il ruolo di mediatori dell'immunità umorale. I **linfociti T**, le cellule dell'immunità cellulare, riconoscono gli antigeni dei microbi intracellulari. I linfociti T agiscono sia aiutando le cellule fagocitiche a eliminare i microbi, o uccidendo loro stessi le cellule infettate. I linfociti T non producono anticorpi. Il loro recettore per l'antigene è costituito da molecole di membrana diverse dagli anticorpi, ma a loro strutturalmente correlate (vedi Cap. 7). I linfociti T hanno una specificità ristretta nei confronti degli antigeni; riconoscono infatti solo antigeni peptidici associati ad alcune proteine codificate dai geni del **complesso maggiore di istocompatibilità** (*Major Histocompatibility Complex*, MHC), espresse sulla superficie delle cellule dell'ospite. Ne consegue che i linfociti T riconoscono e rispondono agli antigeni associati alla superficie cellulare, ma non a quelli solubili (vedi Cap. 6). I linfociti T comprendono popolazioni funzionalmente distinte: quelle definite meglio sono i **linfociti T helper** e i **linfociti T citolitici** o

citotossici (*Cytotoxic T Lynphocytes*, CTL). In risposta alla stimolazione antigenica, i linfociti T helper secernono citochine, che sono responsabili per molte delle risposte dell'immunità innata e adattativa, funzionando quindi come "messaggeri" del sistema immunitario. Le citochine prodotte dai linfociti T stimolano la proliferazione e la differenziazione degli stessi linfociti T e di altre cellule, quali i linfociti B, i macrofagi e altri leucociti. I CTL uccidono le cellule che presentano antigeni estranei non self, come le cellule infettate da virus o da altri microbi intracellulari. Alcuni linfociti T, chiamati **linfociti T regolatori**, svolgono principalmente il ruolo di inibire le risposte immunitarie. Una piccola sottopopolazione di linfociti T possiede nella membrana marker caratteristici delle cellule NK. Queste cellule, il cui ruolo non è ancora stato ben definito, vengono denominate **cellule NKT**. Le proprietà dei linfociti saranno trattate più dettagliatamente nel Capitolo 2 e nei capitoli successivi. I diversi tipi di linfociti possono essere distinti sulla base dell'espressione di molecole di superficie chiamate molecole CD e identificate mediante una numerazione progressiva (vedi Cap. 2).

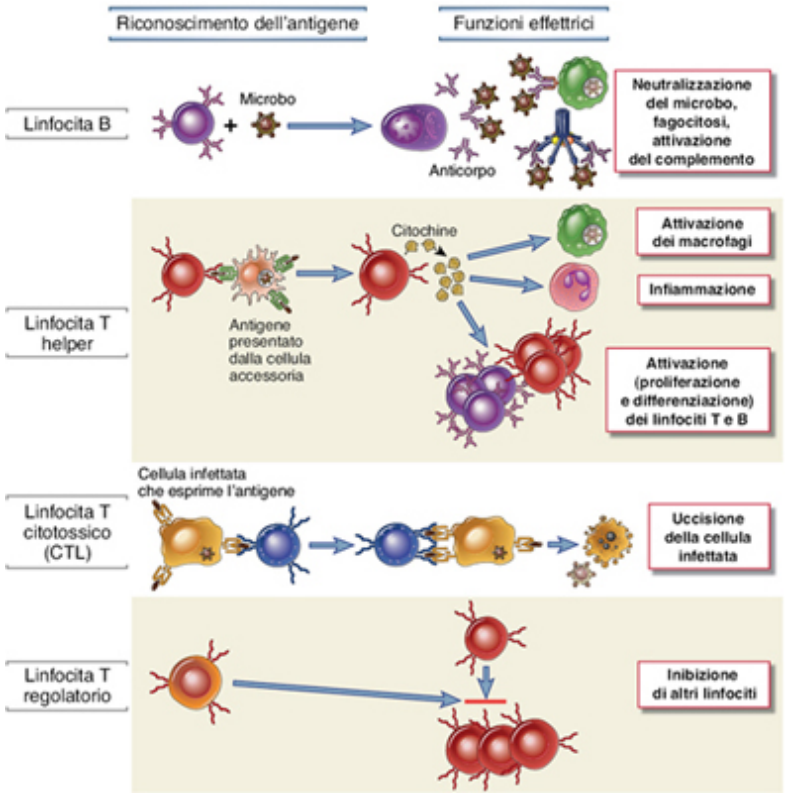


FIGURA 1-5 Classi di linfociti. I linfociti B riconoscono gli antigeni solubili e si differenziano in cellule che producono anticorpi. I linfociti T helper riconoscono gli antigeni presentati sulla superficie delle APC e rispondono producendo citochine che stimolano i meccanismi dell'immunità e dell'infiammazione. I linfociti T citotossici uccidono le cellule infettate in seguito al riconoscimento degli antigeni presenti sulla loro superficie. I linfociti T regolatori sopprimono e prevengono le risposte immunitarie (per esempio ad antigeni self).

L'inizio e lo sviluppo delle risposte immunitarie adattative richiedono che l'antigene sia catturato e presentato ai linfociti specifici. Le cellule che svolgono questo ruolo sono chiamate **cellule accessorie** o **cellule che presentano l'antigene** (*Antigen-Presenting Cell*, APC). Le APC più specializzate in questa funzione sono le cellule dendritiche, che catturano antigeni microbici presenti nell'ambiente circostante. Gli antigeni vengono quindi portati agli organi linfoidi e presentati ai linfociti T naïve per dare inizio alla risposta immunitaria umorale e cellulare. Nei diversi momenti della risposta immunitaria anche altri tipi di cellule possono funzionare come APC. Le funzioni delle APC sono descritte nel Capitolo 6.

L'attivazione dei linfociti in seguito al riconoscimento dell'antigene innesca molteplici meccanismi volti all'eliminazione dell'antigene. Spesso, l'eliminazione dell'antigene richiede la partecipazione di **cellule effettrici** che mediano l'effetto finale della risposta immunitaria, vale a dire liberarsi dei microbi. I linfociti T attivati, i fagociti mononucleati e altri leucociti fungono da cellule effettrici delle diverse risposte immunitarie.

I linfociti e le APC sono concentrati in organi linfoidi anatomicamente definiti, all'interno dei quali interagiscono per dare inizio alla risposta immunitaria. I linfociti sono anche presenti nel sangue, dal quale possono ricircolare ai tessuti linfoidi e raggiungere i tessuti periferici dove sono presenti gli antigeni da eliminare (vedi Cap. 3).

Sia le fasi iniziali sia quelle effettrici delle risposte innate sono caratterizzate dall'interazione dei leucociti tra loro e con altre cellule dell'ospite; molte di queste interazioni si basano sull'azione di e citochine. Le funzioni delle citochine verranno esaminate di volta in volta in base al loro coinvolgimento nelle risposte immuni.

INTRODUZIONE ALL'IMMUNITÀ ANTIMICROBICA

Ora che abbiamo descritto le componenti principali e le proprietà del sistema immunitario, è utile riassumere le strategie attivate nei confronti dei diversi tipi di microrganismi. Questa introduzione rappresenta la base per tutti gli argomenti che saranno discussi nel presente volume. Il sistema immunitario deve fronteggiare molti e diversi tipi di microbi. Come vedremo tra poco, alcune caratteristiche delle risposte immuni sono comuni a tutti i tipi di patogeni, mentre altre sono specifiche per un determinato tipo di microrganismo. Cominciamo esaminando le risposte dell'immunità innata.

Risposte dell'immunità innata

Il sistema immunitario innato ha il compito di impedire l'ingresso e di annullare o almeno limitare la crescita dei microrganismi che stanno colonizzando un tessuto. Le principali aree che costituiscono un'interfaccia con l'ambiente, cioè la cute, i polmoni e gli apparati gastrointestinale e respiratorio, sono rivestite da uno strato uniforme di epitelio che svolge il ruolo di barriera, la quale previene l'ingresso dei microrganismi dall'ambiente circostante. Quando i microrganismi riescono a superare la barriera epiteliale vengono intercettati da altre cellule dell'immunità innata. La risposta cellulare dell'immunità innata è rappresentata da due principali strategie: l'infiammazione e la risposta antivirale. L'**infiammazione** consiste nel richiamo delle proteine plasmatiche e dei leucociti circolanti nei tessuti, dove vengono attivati per eliminare i microbi. Molte di queste reazioni richiedono l'azione di citochine prodotte da cellule dendritiche, macrofagi e altri tipi cellulari. Le cellule fagocitiche, i neutrofili (che hanno una limitata sopravvivenza nei tessuti) e i monociti (che si differenziano in macrofagi tissutali) costituiscono i principali tipi leucocitari reclutati durante la risposta infiammatoria. I fagociti ingeriscono microbi e cellule morte, distruggendoli nelle vescicole intracellulari. Le **difese antivirali** si basano sull'azione di alcune citochine che conferiscono alla cellula la resistenza all'infezione e attivano le cellule specializzate del sistema immunitario innato, le cellule natural killer (NK), a uccidere le cellule infettate.

I microbi in grado di resistere ai meccanismi di difesa presenti nei tessuti entrano in circolo, dove vengono riconosciuti da proteine dell'immunità innata. Tra queste, le più importanti fanno parte del sistema del complemento. Quando le proteine del sistema del complemento sono attivate

in seguito al contatto con le superfici microbiche, vengono tagliate e attivano diverse risposte infiammatorie. Inoltre, queste proteine possono rivestire la superficie (opsonizzare) dei microbi al fine di favorirne la fagocitosi e la lisi. Durante la risposta infiammatoria, altre proteine plasmatiche si accumulano nel sito di infezione e aiutano a combattere i microbi presenti nei tessuti.

L'immunità innata è particolarmente efficace nel controllo e persino nell'eliminazione di molti tipi di infezione. Tuttavia, come citato in precedenza, una caratteristica saliente di molti microrganismi patogeni è quella di essersi evoluti per resistere a queste strategie. La difesa verso questo tipo di patogeni necessita dell'intervento dell'immunità specifica.

Risposte dell'immunità adattativa

L'immunità adattativa utilizza tre principali strategie.

- ***Anticorpi.*** La secrezione di anticorpi, che legano i microrganismi extracellulari e ne impediscono l'interazione con le cellule dell'ospite. Gli anticorpi promuovono anche la loro ingestione e uccisione da parte dei fagociti.
- ***Fagocitosi.*** Le cellule fagocitiche ingeriscono e uccidono i microbi con l'aiuto dei linfociti T helper e degli anticorpi, che ne aumentano il potenziale microbicida.
- ***Uccisione cellulare.*** I CTL uccidono le cellule infettate, in cui i microrganismi non sono accessibili all'azione degli anticorpi e ai meccanismi litici dei fagociti.

L'obiettivo dell'immunità adattativa è attivare uno o più meccanismi di difesa nei confronti dei microbi che si localizzano in diversi distretti anatomici, come il tratto gastroenterico o le vie aeree, il circolo o all'interno delle cellule dell'ospite.

Tutte le risposte adattative si sviluppano in fasi sequenziali, ognuna delle quali corrisponde a specifiche azioni dei linfociti (Fig. 1-6).

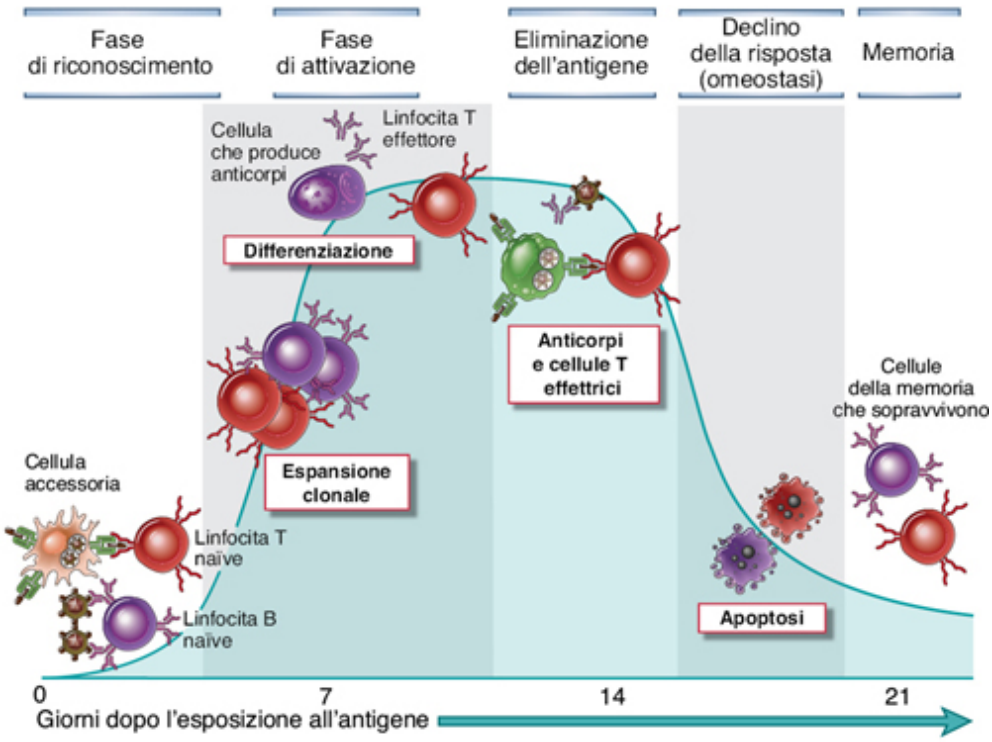


FIGURA 1-6 Fasi della risposta immunitaria adattativa. La risposta immunitaria adattativa consiste di fasi distinte, di cui le prime tre sono il riconoscimento dell'antigene, l'attivazione dei linfociti e l'eliminazione dell'antigene (fase effettrice). La risposta si esaurisce poiché i linfociti stimolati dall'antigene muoiono per apoptosi (ripristinando le condizioni omeostatiche), mentre le cellule che sopravvivono sono responsabili della memoria. La durata di ciascuna fase può variare nell'ambito delle diverse risposte. L'asse delle ordinate rappresenta una misura arbitraria dell'entità della risposta. Questi principi si applicano sia all'immunità umorale (mediata dai linfociti B) sia a quella cellulare (mediata dai linfociti T).

Cominciamo questa introduzione all'immunità adattativa dalla prima fase: il riconoscimento dell'antigene.

Cattura e presentazione dell'antigene

Il numero dei linfociti naïve specifici per un dato antigene è estremamente limitato (nell'ordine di 1 ogni 10^5-10^6 linfociti) e la quantità dell'antigene stesso può essere limitata, per questo motivo sono necessari meccanismi particolari che catturino i microrganismi, li concentrino in siti appropriati e presentino i loro antigeni ai linfociti specifici. Le cellule dendritiche localizzate nell'epitelio e nei tessuti connettivi catturano i microrganismi e digeriscono le loro proteine in frammenti, che vengono poi espressi sulla membrana in associazione alle molecole MHC, che sono le proteine

dell’immunità adattativa specializzate nella presentazione dei peptidi antigenici. Le cellule dendritiche trasportano gli antigeni ai linfonodi drenanti dove i linfociti T naïve ricircolano in continuazione. Pertanto, la probabilità che un linfocita T dotato del recettore per un particolare antigene trovi quell’antigene è considerevolmente aumentata attraverso la concentrazione degli antigeni e dei linfociti T nella stessa sede anatomica. Le cellule dendritiche presentano anche peptidi microbici nella milza.

I microrganismi o gli antigeni che raggiungono intatti i linfonodi o la milza sono riconosciuti in loco nella loro forma nativa da linfociti B specifici. Gli antigeni possono inoltre essere presentati ai linfociti B da certe APC presenti negli organi linfoidi.

Riconoscimento dell’antigene da parte dei linfociti

Linfociti specifici per un vasto numero di antigeni sono normalmente presenti prima dell’esposizione all’antigene e, quando un antigene penetra in un organo linfoide secondario, esso si lega (seleziona) alle cellule specifiche per quell’antigene, attivandole (Fig. 1-7). Questo concetto fondamentale, definito **ipotesi della selezione clonale**, fu suggerito da Niels Jerne nel 1955 e più chiaramente enunciato da Macfarlane Burnet nel 1957 come ipotesi per spiegare la capacità del sistema immunitario di rispondere a un grande numero e a una grande varietà di antigeni. Secondo questa ipotesi, i cloni dei linfociti antigene-specifici si sviluppano prima e indipendentemente dall’incontro dell’antigene. Per *clone* si intende un linfocita dotato di una singola specificità e la sua progenie. Una delle caratteristiche importanti del sistema immunitario è quella di produrre un enorme numero di cloni durante il processo di maturazione linfocitaria, aumentando quindi la possibilità di riconoscere microbi diversi.

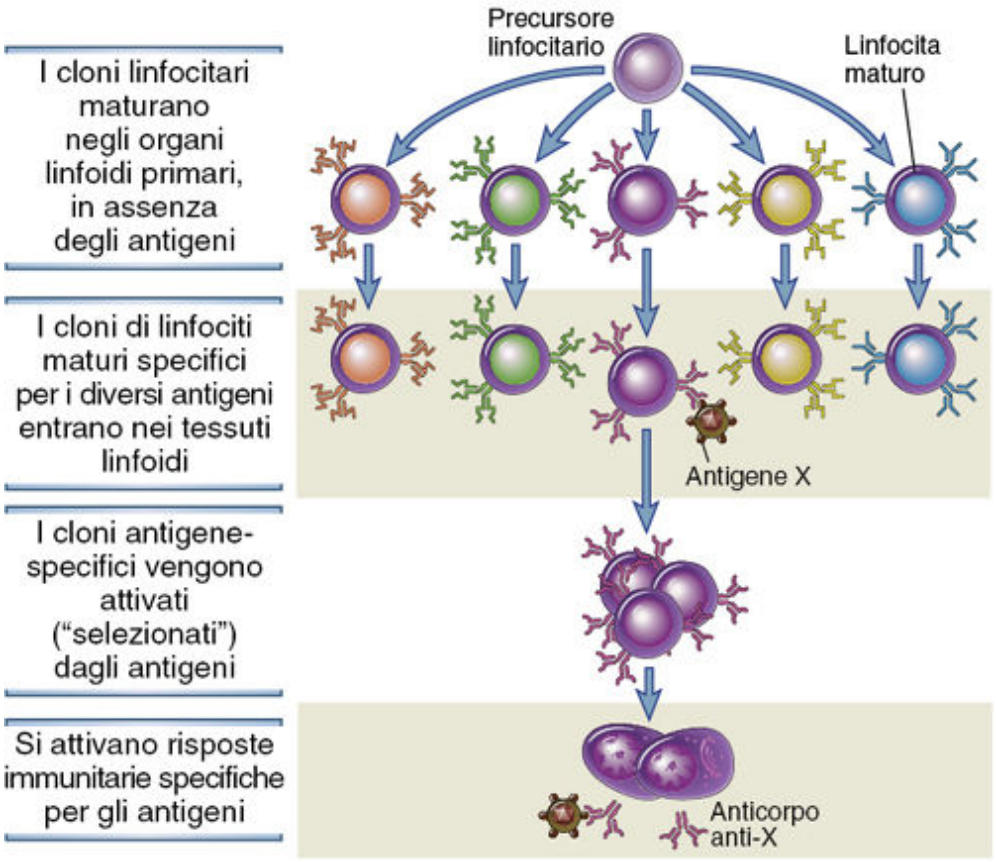


FIGURA 1-7 Teoria della selezione clonale. Ogni antigene (X) seleziona un clone linfocitario preesistente e ne induce la proliferazione e differenziazione. La figura mostra soltanto i linfociti B da cui originano cellule effettrici che producono anticorpi; lo stesso principio vale per i linfociti T.

L'attivazione dei linfociti T naïve richiede il riconoscimento del complesso peptide-MHC presentato dalle cellule dendritiche. Poiché i recettori dei linfociti T sono specifici per peptidi associati a MHC, questi linfociti interagiscono solo con antigeni che sono associati a una cellula (poiché le molecole MHC sono proteine di membrana) e non con antigeni liberi. Questo aspetto è ovviamente importante perché tutte le funzioni dei linfociti T dipendono dall'interazione fisica con altri tipi cellulari. Per rispondere, i linfociti T hanno bisogno di riconoscere non solo gli antigeni, ma anche altre molecole, chiamate molecole **costimolatorie**, che sono espresse dalle APC stimolate dagli agenti microbici. Il riconoscimento dell'antigene determina la specificità della risposta immunitaria, mentre la necessità di molecole costimolatorie assicura che i linfociti T rispondano ai microrganismi (responsabili dell'induzione delle molecole costimolatorie) e non a sostanze innocue.

I linfociti B usano i loro recettori per l'antigene (anticorpi di membrana) per riconoscere antigeni di diversa natura chimica.

L'attivazione dei recettori, insieme ad altri segnali, promuove la proliferazione e la differenziazione dei linfociti. La reattività e le funzioni dei linfociti T e B differiscono in molti aspetti e richiedono di essere esaminate distintamente.

Immunità cellulare: attivazione dei linfociti T ed eliminazione dei microrganismi intracellulari

L'attivazione dei linfociti T helper $CD4^+$ determina la loro proliferazione e differenziazione in cellule effettrici dotate della capacità di produrre citochine. Quando i linfociti T $CD4^+$ naïve sono attivati dall'antigene, secernono la citochina interleuchina-2 (IL-2), che è un fattore di crescita che stimola la proliferazione (espansione clonale) dei cellule specifiche per quell'antigene. Parte della progenie dei linfociti attivati si differenzia in cellule effettrici in grado di produrre diversi tipi di citochine e quindi di svolgere funzioni diverse. Molte cellule effettrici abbandonano gli organi linfoidi in cui si sono differenziate e migrano ai siti di infezione e di infiammazione. Quando i linfociti T effettori incontrano nuovamente cellule infettate svolgono le funzioni effettrici più opportune al fine di eliminare i microrganismi. Alcuni dei linfociti T helper $CD4^+$ producono citochine che reclutano altri leucociti e attivano la produzione di sostanze microbicide nei fagociti. Quindi, questi linfociti T aiutano i fagociti a uccidere i microbi patogeni. Altri linfociti T helper $CD4^+$ producono citochine che aiutano i linfociti B a produrre un tipo di anticorpi chiamati immunoglobuline E (IgE), in grado di attivare gli eosinofili, una sottopopolazioneleucocitaria responsabile dell'uccisione di parassiti di grandi dimensioni che non potrebbero essere fagocitati. Come vedremo in seguito, i linfociti T helper $CD4^+$ stimolano anche la risposta dei linfociti B.

I linfociti $CD8^+$ attivati proliferano e si differenziano in CTL che uccidono le cellule che ospitano microrganismi intracellulari. Questi patogeni possono essere virus che infettano diversi tipi di cellule o batteri che, pur essendo stati fagocitati dai macrofagi, hanno imparato a fuoriuscire nel citoplasma dalle vescicole fagocitiche (dove sono inaccessibili ai

meccanismi citotossici). L'uccisione delle cellule infettate da parte dei CTL ha lo scopo di eliminare i focolai infettivi.

Immunità umorale: attivazione dei linfociti B ed eliminazione dei microrganismi extracellulari

L'attivazione da parte dell'antigene dei linfociti B comporta la proliferazione e la differenziazione in cellule in grado di produrre classi diverse di anticorpi dotati di funzioni distinte. La risposta dei linfociti B agli antigeni proteici richiede l'intervento (*help*) dei linfociti T helper $CD4^+$ (che per questa ragione sono detti *helper*). I linfociti B possono rispondere a molti antigeni di origine non proteica in assenza dell'intervento dei linfociti T helper.

Parte della progenie dei linfociti B attivati si differenzia in **plasmacellule** che producono anticorpi. Ogni plasmacellula produce anticorpi dotati di un'unica specificità antigenica simile a quella degli anticorpi presenti sulla superficie (recettori dei linfociti B) della cellula che inizialmente ha riconosciuto l'antigene. I polisaccaridi e gli antigeni lipidici stimolano principalmente la produzione di IgM. Gli antigeni proteici possono stimolare la produzione, da parte di un singolo clone B, di anticorpi di diverse classi (IgG, IgA, IgE). La produzione di classi anticorpali con diverse funzioni viene definita scambio isotipico e richiede l'intervento dei linfociti T helper. Tale processo fornisce alla risposta anticorpale una certa plasticità permettendole di svolgere molte funzioni. I linfociti T helper stimolano anche la produzione di anticorpi dotati di una migliore affinità per l'antigene. Questo processo, definito maturazione dell'affinità, migliora la qualità della risposta umorale.

L'immunità umorale combatte i microrganismi attraverso molteplici strategie. Gli anticorpi, legandosi ai microbi, prevengono l'infezione delle cellule dell'ospite, quindi neutralizzano i microbi. Di fatto, gli anticorpi costituiscono l'unico meccanismo dell'immunità specifica che blocca le infezioni prima che queste abbiano luogo; questa è la ragione per cui la vaccinazione ha lo scopo di indurre la produzione di una forte risposta anticorpale. Le IgG rivestono i microrganismi e li rendono facile bersaglio per la fagocitosi poiché le cellule fagocitiche (neutrofili e macrofagi) esprimono recettori per alcune porzione delle IgG. Le IgG e le IgM attivano la via del complemento, la quale a sua volta produce componenti in grado di

promuovere la fagocitosi e l'eliminazione dei microbi. Alcuni anticorpi svolgono una funzione particolare in determinati compartimenti anatomici. Le IgA sono secrete dagli epiteli delle mucose e neutralizzano i microbi presenti nei tessuti mucosi, come quelli del tratto respiratorio e gastrointestinale. Le IgG materne sono attivamente trasportate attraverso la placenta e proteggono il nascituro fino a quando il suo sistema immunitario raggiunge la maturità. La maggior parte degli anticorpi ha un'emivita di pochi giorni, ma la maggioranza delle IgG raggiunge un'emivita di circa 3 settimane. Tuttavia, alcune plasmacellule migrano al midollo osseo e sopravvivono per anni continuando a produrre bassi livelli di anticorpi. Gli anticorpi prodotti da queste cellule forniscono una protezione immediata nei confronti di una successiva infezione da parte dello stesso microbo. Una protezione ancora più efficace è fornita dalle cellule della memoria che si differenziano rapidamente in seguito all'attivazione da parte del microrganismo in plasmacellule.

Memoria immunologica

Le risposte immunitarie efficaci sono in grado di eradicare l'infezione microbica che aveva dato inizio alla risposta. Tale fase è seguita da quella della risoluzione in cui la popolazione linfocitaria che si era espansa muore per ripristinare l'omeostasi.

L'attivazione iniziale dei linfociti genera **cellule di memoria** a lunga sopravvivenza, che possono sopravvivere per anni dopo l'infezione. Le cellule di memoria sono più efficaci dei linfociti naïve nel combattere l'infezione perché, come già detto, esse costituiscono una popolazione espansa di linfociti antigene-specifici (più numerosi dei linfociti naïve specifici per lo stesso antigene) e sono più veloci ed efficaci a rispondere all'antigene rispetto a cellule naïve. Questa è la ragione per cui la generazione di cellule della memoria rappresenta il secondo più importante obiettivo della terapia vaccinale. Discuteremo le proprietà dei linfociti della memoria nei prossimi capitoli.

Nel resto del libro descriveremo in dettaglio il riconoscimento, l'attivazione, la regolazione e le fasi effettrici delle risposte dell'immunità adattativa. I fondamenti introdotti in questo capitolo ci accompagneranno nella lettura dell'intero trattato.

RIEPILOGO

* La protezione immunitaria contro i microbi è inizialmente mediata dalle reazioni dell'immunità innata e successivamente dalle risposte dell'immunità adattativa. L'immunità innata è stimolata da strutture molecolari condivise dai vari gruppi di microbi e da molecole espresse da cellule dell'ospite alterate. L'immunità adattativa è specifica per i differenti antigeni, microbici e non, e viene potenziata da ripetute esposizioni all'antigene (memoria immunologica).
* L'immunità umorale è mediata dai linfociti B e dai loro prodotti di secrezione, come gli anticorpi, ed è coinvolta nel meccanismo di difesa contro i microbi extracellulari. L'immunità cellulare è mediata dai linfociti T e dai loro prodotti, come le citochine, ed è importante per la difesa contro i microbi intracellulari.
* L'immunità può essere acquisita attraverso la risposta all'antigene (immunità attiva) oppure mediante il trasferimento di anticorpi o di cellule effettrici (immunità passiva).
* Il sistema immunitario possiede molte caratteristiche di fondamentale importanza per il suo funzionamento. Tra queste ricordiamo la specificità per l'antigene, un repertorio diversificato in grado di riconoscere un'ampia varietà di antigeni, la memoria nei confronti dell'esposizione all'antigene, la capacità di una rapida espansione clonale dei linfociti specifici per un certo antigene, la specializzazione delle risposte verso i diversi microbi, il mantenimento dell'omeostasi e la capacità di discriminare tra antigeni estranei e autologhi.
* I linfociti sono le sole cellule in grado di riconoscere un antigene in modo specifico e quindi rappresentano le principali cellule dell'immunità adattativa. Nel suo complesso la popolazione linfocitaria consiste di molti cloni, ognuno dei quali dotato di un recettore con una unica specificità. Le due classi principali di linfociti sono le cellule B e T, che differiscono per il tipo di recettori per l'antigene e per le funzioni. L'antigene viene catturato e presentato ai linfociti da parte di cellule accessorie. L'eliminazione dell'antigene spesso ha bisogno del coinvolgimento di varie cellule effettrici.
* La risposta immunitaria adattativa inizia con il riconoscimento di un antigene non self da parte di linfociti specifici. I linfociti rispondono proliferando e differenziandosi in cellule effettrici, la cui funzione è eliminare l'antigene, e in cellule della memoria, che esprimono un'aumentata risposta al successivo incontro con l'antigene. L'attivazione dei linfociti richiede il riconoscimento dell'antigene e di ulteriori segnali che vengono forniti dai microbi o dall'immunità innata.
* I linfociti T helper $CD4^+$ aiutano i macrofagi a eliminare i microbi ingeriti e i linfociti B a produrre anticorpi. I linfociti $CD8^+$ CTL uccidono le cellule che ospitano patogeni intracellulari, eliminando pertanto focolai di infezione. Gli anticorpi, i prodotti dei linfociti B, neutralizzano i microrganismi infettivi, promuovono l'eliminazione dei microbi da parte dei fagociti e attivano il sistema del complemento.

LETTURE CONSIGLIATE

Burnet FM: A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection, *Australian Journal of Science* 20:67–69, 1957.

Jerne NK: The natural-selection theory of antibody formation, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 41: 849–857, 1955.

Litman GW, Rast JP, Fugmann SD: The origins of vertebrate adaptive immunity, *Nature Reviews Immunology* 10:543–553, 2010.

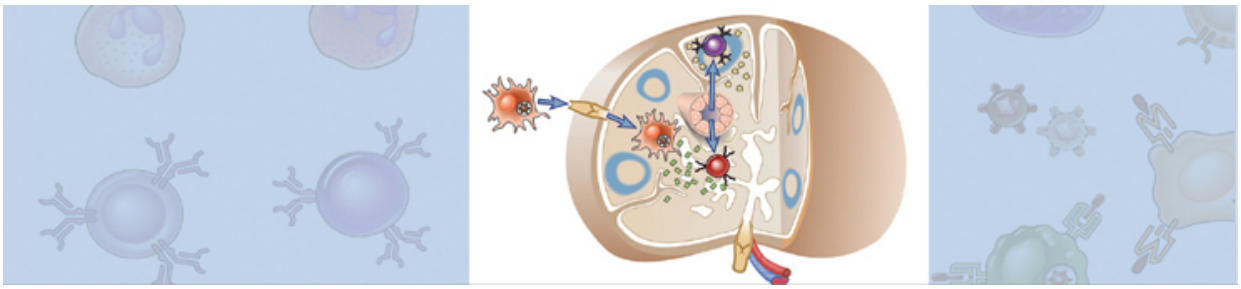
Silverstein AM: *Paul Erlich's receptor immunology: the magnificent obsession*, New York, 2001, Academic Press.

Silverstein AM: Cellular versus humoral immunology: a centurylong dispute, *Nature Immunology* 4:425–428, 2003.

Travis J: On the origins of the immune system, *Science* 324:580–582, 2009.

CAPITOLO

2



Cellule e tessuti del sistema immunitario

CELLULE DEL SISTEMA IMMUNITARIO

- Fagociti
- Mastociti, basofili ed eosinofili
- Cellule che presentano l’antigene
- Linfociti
- Cellule linfoidi innate

ANATOMIA E FUNZIONI DEI TESSUTI LINFOIDI

- Midollo osseo
- Timo
- Sistema linfatico
- Linfonodi
- Milza
- Strutture linfoidi dei distretti periferici

RIEPILOGO

Le cellule del sistema immunitario innato e adattativo sono normalmente presenti come cellule circolanti nel sangue e nella linfa, come raggruppamenti anatomicamente definiti negli organi linfoidi e come singole cellule disseminate praticamente in tutti i tessuti. L’organizzazione anatomica di queste cellule e la loro capacità di circolare tra sangue, linfa e tessuti sono di vitale importanza per la generazione delle risposte immunitarie. Nelle risposte protettive nei confronti di agenti infettivi, il sistema immunitario deve fare fronte a molteplici situazioni. In primo luogo, deve essere in grado di rispondere a un numero limitato di microbi rispetto alla miriade di antigeni che possono penetrare in qualsiasi sede anatomica. In secondo luogo, solo un numero molto ridotto di linfociti naïve (vergini) è in grado di riconoscere e rispondere in modo specifico ai singoli antigeni. In terzo luogo, i meccanismi effettori del sistema immunitario adattativo (anticorpi e cellule T effettrici) devono poter localizzare ed eliminare i microbi in siti lontani dalla sede iniziale della risposta. La capacità del sistema immunitario di far fronte a questi cambiamenti e di svolgere le sue funzioni protettive in modo ottimale dipende dalle risposte eccezionalmente rapide e diversificate delle cellule del sistema immunitario e dal modo in cui

tali cellule, benché organizzate in tessuti linfoidi, siano tuttavia in grado di migrare da un tessuto all'altro.

Questo capitolo descrive le cellule e i tessuti che costituiscono il sistema immunitario. Nel Capitolo 3 descriveremo i modi in cui i linfociti si distribuiscono in tutto l'organismo e i meccanismi attraverso cui i linfociti e gli altri leucociti migrano nei tessuti.

CELLULE DEL SISTEMA IMMUNITARIO

Le cellule fagocitiche, le cellule dendritiche e varie altre cellule accessorie che hanno il compito di eliminare gli antigeni svolgono ruoli specializzati nelle risposte immunitarie innate e adattative. Queste cellule sono state presentate brevemente nel Capitolo 1. Questo capitolo si occupa della morfologia e delle caratteristiche funzionali delle cellule del sistema immunitario e di come esse siano organizzate nei tessuti linfoidi. La frequenza di alcuni di questi tipi cellulari nel sangue è elencata nella Tabella 2-1. Nonostante la maggior parte di queste cellule si trovi nel sangue, le loro risposte funzionali si verificano generalmente nel tessuto linfoide e in altri tipi di tessuto, pertanto potrebbero non correlare con cambiamenti del numero di cellule circolanti.

TABELLA 2-1 Valori normali delle cellule ematiche

	Numero medio per microlitro	Intervallo normale
Globuli bianchi (leucociti)	7.400	4.500-11.000
Neutrofili	4.400	1.800-7.700
Eosinofili	200	0-450
Basofili	40	0-200
Linfociti	2.500	1.000-4.800
Monociti	300	0-800

Fagociti

I fagociti, i neutrofili e i macrofagi sono cellule la cui funzione primaria è quella di ingerire ed eliminare i microrganismi e i tessuti danneggiati. Le risposte funzionali dei fagociti nella difesa dell'ospite avvengono in tappe

successive: reclutamento attivo delle cellule ai siti di infezione, riconoscimento dei microbi e attivazione mediante il processo di fagocitosi e uccisione dei microbi ingeriti. I fagociti comunicano inoltre con le altre cellule per favorire o regolare la risposta immunitaria; questo avviene per contatto diretto e tramite il rilascio di citochine. Queste funzioni dei fagociti sono importanti nell'immunità innata, che verrà trattata nel Capitolo 4, e anche nella fase effettrice di alcune risposte adattative, come si vedrà nel Capitolo 10. Anticipando una discussione che verrà più dettagliatamente affrontata nei capitoli successivi, descriveremo qui le caratteristiche morfologiche dei neutrofili e dei macrofagi e introdurremo brevemente le loro risposte funzionali.

Neutrofili

I neutrofili, detti anche leucociti polimorfonucleati, costituiscono la popolazione cellulare più abbondante nell'ambito dei globuli bianchi circolanti e sono responsabili delle prime fasi della risposta infiammatoria. I neutrofili circolano sotto forma di cellule tondeggianti di 12-15 μm di diametro con numerose estroflessioni di membrana. Il nucleo di un neutrofilo è segmentato in 3-5 lobuli collegati, da cui il sinonimo *leucociti polimorfonucleati* (Fig. 2-1, *A*). Il citoplasma contiene due tipi di granuli. La maggior parte di essi, detti granuli specifici, contiene enzimi come il lisozima, la collagenasi e l'elastasi. Questi granuli non si colorano intensamente né con i coloranti basici né con quelli acidi (ematossilina ed eosina, rispettivamente), il che distingue i granuli dei neutrofili da quelli dei **basofili** e degli **eosinofili**. Il resto dei granuli, chiamati granuli azzurrofili, è costituito da lisosomi che contengono enzimi e altre sostanze microbicide, quali le defensine e le catelicidine, che saranno discusse nel Capitolo 4. I neutrofili vengono prodotti nel midollo osseo e derivano da precursori che danno inoltre origine ai fagociti mononucleati. La produzione dei neutrofili è stimolata da una citochina chiamata fattore stimolante le colonie di granulociti (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*, G-CSF). Un individuo adulto produce più di 1×10^{11} neutrofili al giorno, ognuno dei quali resta in circolo per 6 ore o pochi giorni. I neutrofili arrivano al sito di infezione nell'arco di alcune ore dall'ingresso dei microrganismi. Anche dopo il loro

ingresso nei tessuti, i neutrofili rimangono attivi solo per 1 o 2 giorni e poi muoiono.

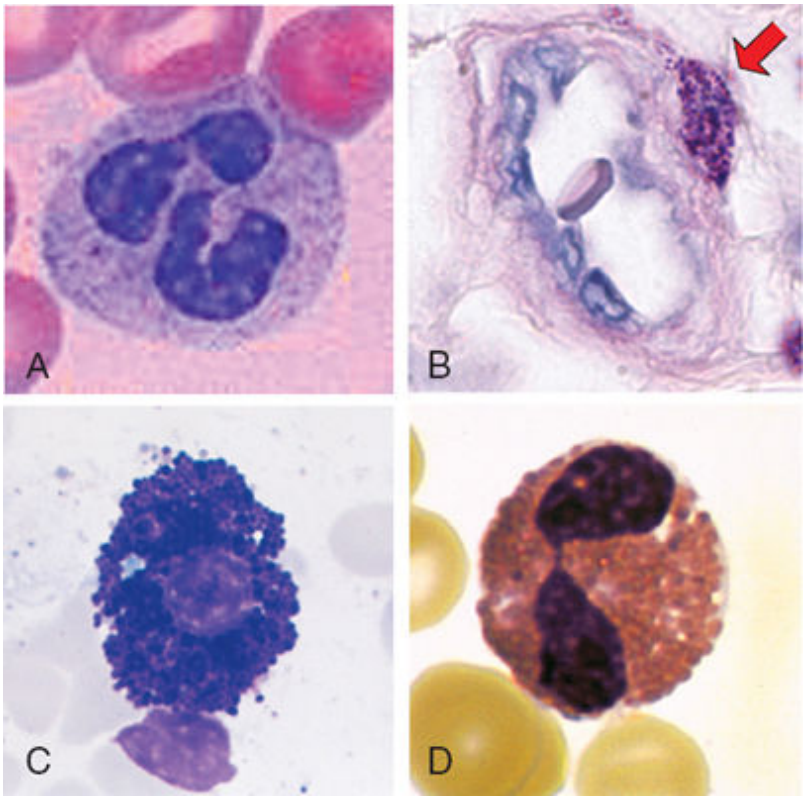


FIGURA 2-1 Morfologia dei neutrofili, dei mastociti, dei basofili e degli eosinofili. A. L'immagine al microscopio di un neutrofilo del sangue colorato con Wright-Giemsa mostra il nucleo multilobato, motivo per cui queste cellule sono chiamate anche leucociti polimorfonucleati, e granuli citoplasmatici debolmente visibili. **B.** L'immagine al microscopio di una sezione di cute colorata con Wright-Giemsa mostra un mastocita (*freccia*) adiacente a un piccolo vaso sanguigno, identificabile dai globuli rossi presenti nel suo lume. I granuli citoplasmatici, che hanno una colorazione porpora, contengono istamina e altri mediatori che agiscono sui vasi sanguigni adiacenti per far aumentare il flusso sanguigno e l'arrivo nel tessuto di proteine del plasma e di leucociti. (*Per gentile concessione del Dr. George Murphy, Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusets*.) **C.** L'immagine al microscopio di un basofilo del sangue, colorato con Wright-Giemsa, mostra i caratteristici granuli colorati in *blu*. (*Per gentile concessione del Dr. Jonathan Hecht, Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts.*) **D.** L'immagine al microscopio di un eosinofilo del sangue colorato con Wright-Giemsa mostra il tipico nucleo segmentato e i granuli citoplasmatici colorati in *rosso*.

Fagociti mononucleati

Il sistema dei fagociti mononucleati è costituito da cellule circolanti chiamate monociti e da cellule presenti nei tessuti chiamate macrofagi. I macrofagi, che sono ampiamente distribuiti negli organi e nel tessuto

connettivo, svolgono un ruolo centrale sia nell'immunità innata sia nell'immunità adattativa. Molti tessuti sono popolati da macrofagi residenti estremamente longevi che derivano da precursori presenti nel sacco vitellino e nel fegato fetale durante lo sviluppo prenatale e assumono fenotipi specifici a seconda dell'organo (Fig. 2-2). Ne sono esempi le cellule di Kupffer che rivestono i sinusoidi del fegato, i macrofagi sinusoidali nella milza, i macrofagi alveolari nelle vie aeree polmonari e le cellule della microglia nel cervello. Negli adulti, le cellule della linea macrofagica derivano da cellule specifiche preesistenti nel midollo osseo, stimolate da una citochina chiamata M-CSF *(Monocyte Colony-Stimulating Factor*), fattore che stimola le colonie monocitiche (o macrofagiche). Questi precursori maturano dando origine ai monociti, che entrano nel circolo ematico (vedi Fig. 2-2) e successivamente migrano nei tessuti, specialmente nel corso di reazioni infiammatorie, dove subiscono un'ulteriore maturazione diventando macrofagi.

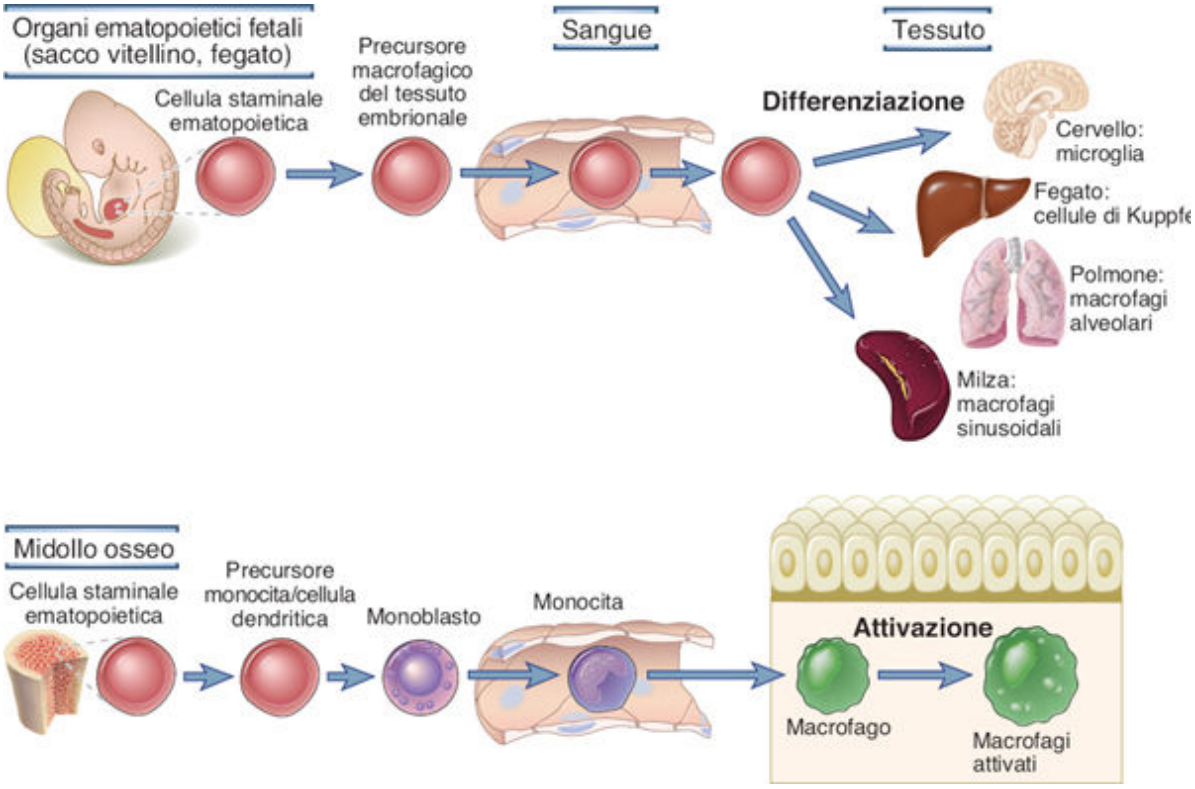


FIGURA 2-2 Maturazione dei fagociti mononucleati e delle cellule dendritiche. I macrofagi tissutali residenti, che si differenziano in forme specializzate in particolari organi, derivano da precursori presenti nel sacco vitellino e nel fegato durante la vita fetale. I monociti derivano da un precursore mieloide midollare, circolano nel sangue e sono presenti nei tessuti durante le reazioni infiammatorie, dove subiscono una successiva maturazione divenendo macrofagi. Esiste un tipo di monociti ematici che possiede delle funzioni infiammatorie distinte o riparative (non mostrato in figura).

I monociti hanno un diametro di 10-15 μm, presentano nuclei a forma di fagiolo e granulazioni citoplasmatiche fini che contengono lisosomi, vacuoli fagocitici e filamenti del citoscheletro (Fig. 2-3). I monociti sono eterogenei e consistono di differenti sottotipi distinguibili grazie alla presenza di marcatori cellulari di superficie e alle loro funzioni. Sia nell'uomo sia nel topo, i monociti più numerosi, talvolta chiamati monociti classici, producono mediatori infiammatori in maniera abbondante e si dirigono rapidamente verso i siti di infezione, o dove si è verificato un danno tissutale. Nell'uomo, questi monociti sono identificati da un'espressione elevata sulla membrana plasmatica di CD14 e dalla mancanza di CD16 ($CD14^{++}CD16^{-}$), laddove nel topo questa popolazione è identificata come $Ly6c^{high}$. I monociti non classici, che costituiscono una minoranza dei monociti ematici, sono $CD14^{+}CD16^{++}$ nell'uomo e $Ly6c^{low}$ nel topo. Queste cellule contribuiscono alla riparazione tissutale successiva al danno e si muovono rotolando lungo la superficie delle cellule endoteliali (movimento definito con il nome di *patrolling*). È stato inoltre descritto un sottotipo umano con fenotipo intermedio ($CD14^{++}CD16^{+}$).

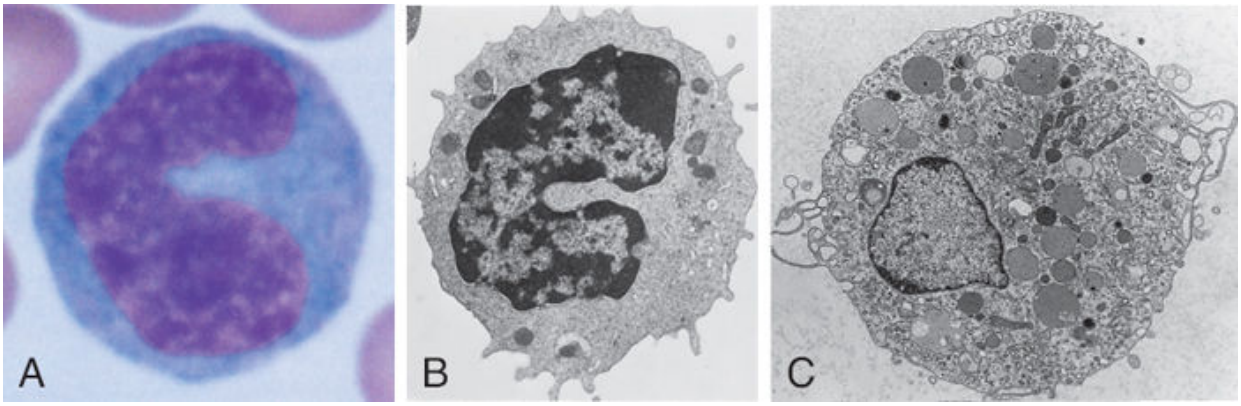


FIGURA 2-3 Morfologia dei fagociti mononucleati. A. Immagine al microscopio ottico di un monocita da sangue periferico. **B.** Immagine al microscopio elettronico di un monocita da sangue periferico. (*Per gentile concessione del Dr. Noel Weidner, Department of Pathology, University of California, San Diego*.) **C.** Immagine al microscopio elettronico di un macrofago tissutale attivato, che mostra molti vacuoli fagocitici e organelli citoplasmatici. (*Da Fawcett DW: Bloom and Fawcett: a textbook of histology, 12th ed, New York, 1994, Chapman & Hall. Per gentile concessione di Springer Science and Business Media*.)

I macrofagi tissutali svolgono numerose e importanti funzioni nell'immunità innata e adattativa.

- La principale funzione dei macrofagi nella difesa dell'organismo è ingerire e uccidere i microbi. I meccanismi di uccisione, che saranno discussi nel Capitolo 4, comprendono la generazione per via enzimatica di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto, che sono tossiche per i microbi, e la digestione proteolitica.
- Oltre a ingerire i microbi, i macrofagi contribuiscono alla risoluzione del processo infiammatorio attraverso l'ingestione e la degradazione delle cellule morte dell'ospite, incluse quelle che muoiono nei tessuti in seguito a un trauma o a un'interruzione del circolo ematico, e i neutrofili che si accumulano nei siti di flogosi. Questo fa parte del processo di pulizia successivo a infezioni o a un danno sterile al tessuto. Inoltre, i macrofagi riconoscono e fagocitano le cellule apoptotiche prima che queste possano rilasciare il loro contenuto e attivare risposte infiammatorie. Durante la vita di un individuo, le cellule non necessarie muoiono fisiologicamente per apoptosi, come durante lo sviluppo, la crescita e il rinnovo fisiologico dei tessuti; tutte queste cellule morte sono eliminate dai macrofagi.
- I macrofagi attivati secernono numerose citochine, che agiscono sulle cellule endoteliali che rivestono i vasi sanguigni per incrementare il reclutamento di un maggior numero di monociti e di altri leucociti dal sangue nei siti di flogosi, amplificando così la risposta protettiva nei confronti dei microbi. Alcune delle citochine importanti di derivazione macrofagica sono trattate nel Capitolo 4.
- I macrofagi sono cellule che presentano l'antigene e attivano i linfociti T. Questa funzione è importante nella fase effettrice delle risposte immunitarie in cui sono coinvolti i linfociti T (vedi Cap. 10).

- I macrofagi contribuiscono alla riparazione dei tessuti danneggiati stimolando la crescita di nuovi vasi sanguigni (angiogenesi) e la sintesi della matrice extracellulare ricca di collageno (fibrosi). Queste funzioni vengono esercitate mediante la produzione di citochine che agiscono su varie cellule nei tessuti.

L'attivazione delle diverse funzioni macrofagiche avviene in seguito al riconoscimento di svariate strutture microbiche e di molecole prodotte dall'ospite in risposta alle infezioni e alle lesioni. Le molecole attivatorie si legano a recettori specifici, localizzati sulla superficie dei macrofagi o al loro interno, in grado di attivare cascate di trasduzione del segnale. Esempi di questi recettori sono quelli definiti Toll-like, che sono di importanza centrale nell'immunità innata e che verranno discussi in dettaglio nel Capitolo 4. I macrofagi si possono attivare anche in seguito al riconoscimento delle opsonine presenti sulla superficie dei microbi. Le opsonine sono sostanze che rivestono particelle destinate a essere fagocitate. I recettori per il complemento e i recettori per il frammento Fc degli anticorpi, discussi nel Capitolo 13, sono esempi di recettori per le opsonine. Nell'immunità adattativa, i macrofagi sono attivati dalle citochine secrete e da proteine di membrana presenti sui linfociti T, discusse nel Capitolo 10.

I macrofagi possono acquisire capacità funzionali distinte, a seconda degli stimoli a cui sono esposti. L'esempio più evidente è la risposta dei macrofagi a citochine prodotte da sottopopolazioni diverse di linfociti T. Alcune di queste attivano i macrofagi a uccidere i microbi in maniera più efficiente e questo processo viene detto **attivazione classica**. Altre citochine li attivano invece a favorire il rimodellamento e il riparo tissutale e questo processo viene detto **attivazione alternativa**. Queste differenti vie di attivazione e le relative citochine coinvolte sono discusse nel Capitolo 10. I macrofagi possono anche assumere forme diverse dopo l'attivazione da parte di stimoli esterni, quali i microbi. Alcuni sviluppano un citoplasma abbondante e sono chiamati cellule epitelioidi per la loro somiglianza con le cellule epiteliali della cute, altri sono in grado di fondersi, formando cellule giganti multinucleate.

I macrofagi rispondono rapidamente ai microrganismi quasi quanto i neutrofili, ma persistono per un tempo molto più lungo nella sede di flogosi. Sopravvivono più a lungo dei neutrofili e, a differenza di essi, non sono

completamente differenziati e possono andare incontro a divisione cellulare nel sito infiammatorio. Di conseguenza, i macrofagi sono le principali cellule effettrici nelle fasi più tardive di una risposta innata e possono persistere anche diversi giorni dopo l'inizio dell'infezione.

Mastociti, basofili ed eosinofili

I mastociti, i basofili e gli eosinofili sono tre tipi cellulari che partecipano alle risposte innate e adattative. La caratteristica comune di queste cellule è la presenza di granuli citoplasmatici contenenti mediatori infiammatori e antimicrobici. Un'altra caratteristica comune è il loro coinvolgimento nelle risposte contro gli elminti e nelle reazioni che provocano malattie allergiche. Presenteremo qui di seguito le caratteristiche di queste cellule, mentre discuteremo più dettagliatamente le loro funzioni nel Capitolo 20.

Mastociti

I mastociti sono cellule di origine midollare localizzate nella cute e negli epiteli delle mucose e che contengono un elevato numero di granuli plasmatici infarciti di istamina e altri mediatori. Il fattore citochinico della cellula staminale (*Stem Cell Factor*, SCF), detto anche ligando di c-Kit, è essenziale per lo sviluppo dei mastociti. In condizioni normali non sono riscontrabili mastociti maturi circolanti, che sono invece presenti nei tessuti, generalmente localizzati in prossimità dei piccoli vasi ematici e dei nervi (Fig. 2-1, *B*). Il loro citoplasma contiene numerosi granuli legati alla membrana, colmi di proteoglicani acidi che legano i coloranti basici. I mastociti esprimono recettori di membrana caratterizzati da un'elevata affinità per un tipo di anticorpi chiamati IgE, dei quali sono generalmente rivestiti. Il legame di un antigene con gli anticorpi provoca l'attivazione della cellula e il conseguente rilascio nello spazio extracellulare, del contenuto dei granuli citoplasmatici. Il rilascio del contenuto dei granuli, che include l'istamina, induce alterazioni dei vasi sanguigni che causano l'infiammazione. I mastociti agiscono come sentinelle nei tessuti, dove essi riconoscono i prodotti microbici e rispondono producendo citochine e altri mediatori che inducono la flogosi. Queste cellule forniscono una difesa contro gli elmiti e altri microbi, ma sono altresì responsabili dei sintomi delle malattie allergiche (vedi Cap. 20).

Basofili

I basofili sono granulociti del circolo ematico caratterizzati da analogie strutturali e funzionali con i mastociti. Come gli altri granulociti, i basofili derivano da progenitori midollari (una linea maturativa differente da quella dei mastociti), maturano nel midollo osseo e circolano nel sangue. I basofili costituiscono meno dell'1% dei leucociti ematici (vedi Tab. 2-1) e, sebbene non siano normalmente presenti nei tessuti, possono essere richiamati in alcune sedi infiammatorie. I basofili contengono granuli che legano i coloranti basici (Fig. 2-1, *C*) e sono capaci di sintetizzare molti dei mediatori contenuti nei mastociti. Come i mastociti, i basofili esprimono recettori di membrana per gli anticorpi della classe IgE, legano le IgE e possono essere attivati in seguito al legame dell'antigene da parte delle IgE. Dal momento che sono numericamente molto scarsi nei tessuti, la loro importanza per la difesa dell'organismo e per le reazioni allergiche è incerta.

Eosinofili

Gli eosinofili sono granulociti presenti nel sangue dotati di granuli citoplasmatici contenenti enzimi che danneggiano la parete cellulare dei parassiti, ma che possono anche danneggiare i tessuti dell'ospite. I granuli eosinofili contengono proteine basiche che legano i coloranti acidi come l'eosina (vedi Fig. 2-1, *D*). Come i neutrofili e i basofili, gli eosinofili derivano dal midollo osseo. La citochina GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*, fattore stimolante le colonie di granulociti e macrofagi), l'interleuchina (IL)-3 e l'IL-5 promuovono la maturazione degli eosinofili dai precursori mieloidi. Alcuni eosinofili sono normalmente presenti nei tessuti periferici, soprattutto nelle mucose degli apparati respiratorio, gastrointestinale e genitourinario. In questi tessuti, il loro numero tende comunque ad aumentare contestualmente al loro richiamo durante il processo infiammatorio.

Cellule che presentano l'antigene

Le cellule che presentano l'antigene (*Antigen Presenting Cells, *APC) – o cellule accessorie – sono cellule che catturano i microbi e altri antigeni e li presentano ai linfociti fornendo segnali in grado di stimolare la

proliferazione e la differenziazione dei linfociti stessi. Per convenzione, il termine APC viene solitamente usato per identificare una cellula che presenta l'antigene ai linfociti T. Le **cellule dendritiche** rappresentano il tipo più importante di APC coinvolto nell'avvio della risposta dei linfociti T. I macrofagi e i linfociti B presentano gli antigeni ai linfociti T durante l'attivazione della risposta umorale e cellulo mediata. Inoltre, un tipo di cellula specializzata, chiamata **cellula dendritica follicolare**, presenta gli antigeni ai linfociti B durante fasi specifiche dell'immunità umorale. Anche molte APC, come le cellule dendritiche e i macrofagi, riconoscono e rispondono ai microbi durante le reazioni immunitarie innate, stabilendo un ponte tra l'immunità innata e l'immunità adattativa. Le funzioni delle APC verranno ulteriormente approfondite nel Capitolo 6.

Cellule dendritiche

Le cellule dendritiche sono le più importanti APC per l'attivazione dei linfociti T naïve. Queste cellule svolgono anche un ruolo importante nelle risposte innate alle infezioni e nel collegare l'immunità innata a quella adattativa. Le cellule dendritiche sono caratterizzate da lunghe protrusioni della membrana e da una spiccata capacità fagocitica e sono ampiamente distribuite nei tessuti linfoidi, nell'epitelio delle mucose e nel parenchima degli organi. La maggior parte delle cellule dendritiche appartiene alla linea differenziativa mieloide e deriva da precursori midollari che possono differenziarsi anche in monociti, ma non in granulociti (Fig. 2-4). La maturazione delle cellule dendritiche necessita di una citochina chiamata ligando di Flt3, che lega il recettore tirosin-chinasico Flt3, presente sui precursori midollari. Come i macrofagi, le cellule dendritiche possiedono recettori che riconoscono molecole espresse in modo specifico dai batteri e rispondono secernendo citochine.

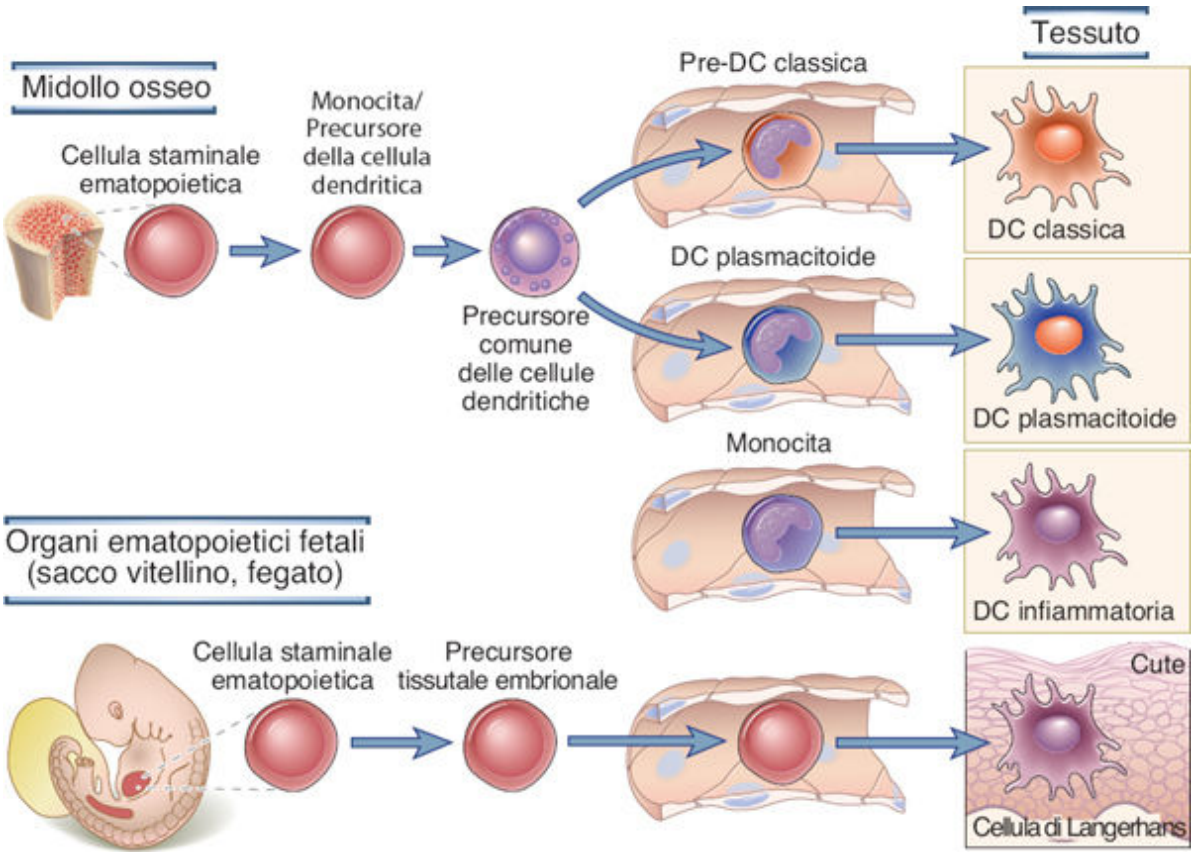


FIGURA 2-4 Maturazione delle cellule dendritiche. Le cellule dendritiche derivano da un precursore comune midollare della linea mieloide e successivamente si differenziano in sottopopolazioni quali le cellule dendritiche convenzionali e le cellule dendritiche plasmacitoidi. Nei tessuti infiammati, le cellule dendritiche infiammatorie possono derivare anche dai monociti; inoltre alcune cellule dendritiche presenti nei tessuti, come le cellule di Langerhans nella cute, possono svilupparsi a partire da precursori embrionali.

La maggior parte delle cellule dendritiche (chiamate **cellule dendritiche classiche** o **convenzionali**) presenti nella cute, nelle mucose e nel parenchima degli organi, risponde ai microbi migrando verso i linfonodi, per presentare gli antigeni proteici di origine microbica ai linfociti T. Una sottopopolazione di cellule dendritiche, dette **cellule dendritiche plasmacitoidi**, è specializzata nella risposta contro le infezioni virali. Queste cellule riconoscono gli acidi nucleici dei virus presenti a livello citoplasmatico e producono proteine solubili, chiamate interferoni di tipo I, che hanno una potente attività antivirale. Le popolazioni di cellule dendritiche possono inoltre derivare dai precursori embrionali e, durante il processo infiammatorio, dai monociti. Il ruolo delle cellule dendritiche come

effettrici dell'immunità innata e come APC verrà discusso rispettivamente nei Capitoli 4 e 6.

Altre cellule che presentano l'antigene

Oltre alle cellule dendritiche, i macrofagi e i linfociti B sono importanti cellule che presentano l'antigene ai linfociti T $CD4^+$ helper. In questo caso i macrofagi presentano l'antigene ai linfociti T direttamente nel sito di infezione e attivano i linfociti T a produrre molecole in grado di attivarli ulteriormente. Questo processo è particolarmente importante per la completa eradicazione dei microbi che, pur essendo stati fagocitati, risultano resistenti all'uccisione. Il compito dei linfociti T helper è potenziare fortemente la capacità microbicida dei macrofagi. I linfociti B presentano gli antigeni ai linfociti T helper e ciò costituisce un momento essenziale nella cooperazione tra i linfociti T helper e i linfociti B nelle risposte anticorpali. Tali funzioni saranno ulteriormente discusse rispettivamente nei Capitoli 10 e 12. I linfociti T citotossici (*Cytotoxic T Lymphocytes*, CTL) sono linfociti effettori $CD8^+$ che uccidono ogni tipo di cellula nucleata che presenti sulla sua superficie l'antigene per cui sono specifici. Pertanto, ogni tipo di cellula nucleata può fungere da APC per i CTL.

Cellule dendritiche follicolari

Le cellule dendritiche follicolari (*Follicular Dendritic Cells*, FDC) sono cellule dotate di prolungamenti della membrana che si trovano disperse in raggruppamenti di linfociti B attivati localizzati nei follicoli linfoidi dei linfonodi, della milza e dei tessuti linfoidi associati alle mucose. Le FDC non derivano da precursori midollari e non sono correlate alle cellule dendritiche che presentano gli antigeni ai linfociti T. Le FDC hanno il compito di captare gli antigeni legati agli anticorpi o ai prodotti del complemento e di esporre tali antigeni sulla loro superficie per il riconoscimento da parte dei linfociti B. Attraverso questo processo, i linfociti B attivati vengono selezionati sulla base dell'affinità dei loro recettori per l'antigene (vedi Cap. 12). Le FDC contribuiscono inoltre all'organizzazione strutturale dei follicoli (vedi più avanti).

Linfociti

I linfociti, le cellule effettrici dell'immunità adattativa, sono le uniche cellule che esprimono in modo clonale i recettori per l'antigene, ognuno con una diversa specificità antigenica. Ogni clone di linfociti T e B esprime recettori per l'antigene ognuno dotato di una singola specificità, che è differente dalle specificità dei recettori presenti in tutti gli altri cloni. Di conseguenza i recettori per l'antigene di questi linfociti sono distribuiti in modo clonale. Come discuteremo qui e nei capitoli successivi, nell'organismo ci sono milioni di cloni di linfociti in grado di riconoscere e rispondere a milioni di antigeni.

Il ruolo dei linfociti come mediatori dell'immunità adattativa si basa su molteplici evidenze sperimentali accumulate nei decenni. Una delle prime indicazioni è stata l'osservazione che alcune immunodeficienze congenite e acquisite sono associate alla riduzione dei linfociti circolanti e di quelli presenti nei tessuti linfoidi. Esperimenti condotti soprattutto in modelli sperimentali hanno mostrato che la protezione nei confronti dei microbi può essere trasferita da animali immunizzati ad animali naïve esclusivamente mediante i linfociti o i loro prodotti di secrezione. Altri esperimenti hanno dimostrato che la stimolazione *in vitro* dei linfociti provoca risposte molto simili a quelle osservate *in vivo* in condizioni più fisiologiche. Dopo l'identificazione dei linfociti come mediatori dell'immunità umorale e cellulare, in breve tempo sono state effettuate molte scoperte sui differenti tipi di linfociti, sulla loro origine dal midollo osseo e dal timo, sul loro ruolo in numerose risposte immunitarie e sulle conseguenze della loro assenza.

Una delle scoperte fondamentali è stata quella relativa alla peculiarità dei meccanismi che portano i linfociti, ma non altri tipi cellulari, a esprimere in modo clonale recettori altamente specifici per gli antigeni. Negli ultimi trent'anni abbiamo assistito a un enorme incremento delle conoscenze sui geni e sulle proteine espresse dai linfociti e sulle loro funzioni. Probabilmente oggi conosciamo i linfociti meglio di ogni altra cellula vivente. Una delle domande più interessanti è stata quella relativa alla capacità dei linfociti di generare un repertorio estremamente vario di recettori per l'antigene dotati di una differente e selettiva specificità, partendo da un numero limitato di geni presenti in configurazione germinativa. Adesso è noto che i geni che codificano per i recettori dell'antigene dei linfociti si formano per ricombinazione genetica durante la maturazione. Gli eventi di tale processo sono casuali e questo permette di

ottenere milioni di geni dotati di specificità molto differenti tra i diversi cloni linfocitari (vedi Cap. 8).

Il numero totale di linfociti in un individuo adulto sano è circa 5×10^{11}. Di questi, il 2% circa sono nel sangue, il 10% circa nel midollo osseo, il 15% circa nei tessuti linfoidi associati alle mucose del tratto gastrointestinale e di quello respiratorio e il 65% circa negli organi linfoidi (prevalentemente nella milza e nei linfonodi). Descriveremo prima le caratteristiche di queste cellule e poi la loro organizzazione nei diversi tessuti linfoidi.

Sottopopolazioni linfocitarie

I linfociti sono costituiti da sottopopolazioni che si differenziano tra di loro in base al tipo di proteine prodotte e alla funzionalità (Tab. 2-2). I tipi principali di linfociti sono stati descritti nel Capitolo 1 (vedi Fig. 1-5). Tutti i linfociti sono morfologicamente simili e la loro morfologia non ne riflette l'eterogeneità o la diversa funzionalità. I **linfociti B** sono le cellule che producono gli anticorpi e hanno questo nome in quanto negli uccelli maturano in un organo denominato borsa di Fabrizio. Nei mammiferi non esiste un equivalente anatomico di questo organo e le fasi precoci della maturazione dei linfociti B hanno luogo nel midollo osseo. Quindi, il termine *linfociti B* si riferisce attualmente a cellule che derivano dal midollo osseo (*bone marrow*). I **linfociti T** sono i mediatori dell'immunità cellulare, sono di origine midollare e migrano e maturano nel timo; il termine *linfocita T* si riferisce quindi alla derivazione timica.

TABELLA 2-2 Popolazioni linfocitarie

Popolazione	Funzioni	Recettore per l'antigene e specificità	Principali marcatori fenotipici	Percentuale rispetto ai linfociti totali*		
				Sangue	Linfonodo	Milza
Linfociti T αβ						
Linfociti T $CD4^+$ helper	Differenziazione delle cellule B (immunità umorale) Attivazione dei macrofagi (immunità cellulo-mediata) Stimolazione o infiammazione	Eterodimeri αβ Specificità diverse per i complessi peptide-MHC di classe II	$CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^-$	35-60†	50-60	50-60
Linfociti T $CD8^+$ citotossici	Uccisione delle cellule infettate da virus o da batteri intracellulari	Eterodimeri αβ Specificità diverse per i complessi peptide-MHC di classe I	$CD3^+$, $CD4^-$, $CD8^+$	15-40	15-20	10-15
Cellule T regolatorie	Soppressione delle funzioni di altre cellule T (regolazione delle risposte immuni, mantenimento della tolleranza verso il self)	Eterodimeri αβ Specificità per antigeni self e alcuni non-self (complessi peptide-MHC di classe II)	$CD3^+$, $CD4^+$, $CD25^+$ $FoxP3^+$ (i più comuni, ma sono presenti anche altri fenotipi)	Rari	10	10
Linfociti NKT	Sopprimono o attivano le risposte immunitarie innate e adattative	Eterodimeri αβ Specificità limitata per complessi glicolipide-CD1	CD56, CD16 (Fc recettori per IgG), CD3	5-30	Rare	10
Linfociti T γδ	Funzioni helper e citotossiche (immunità innata)	Eterodimeri γδ Specificità limitate per antigeni peptidici e non peptidici	$CD3^+$, $CD4^+$, CD8 variabile	Rari	Rari	Rari
Linfociti B						
Linfociti B follicolari	Produzione di anticorpi (immunità umorale)	Ig di superficie Diverse specificità per numerosi tipi di molecole	Recettori per Fc; MHC di classe II; CD19; CD23	5-20	20-25	40-45
Cellule B della zona marginale	Produzione di anticorpi (immunità umorale)	Ig di superficie Specificità limitate per un ristretto gruppo di molecole	IgM, CD27	2-3	3-5	7-10

Questa tabella riassume le principali proprietà dei linfociti appartenenti al sistema immunitario adattativo. Non sono incluse le cellule NK e le altre cellule linfoidi innate, che sono discusse nel Capitolo 4.
*Le percentuali sono approssimative e si basano su dati ottenuti dal sangue periferico umano e dagli organi linfoidi del topo.
†Nella maggioranza dei casi il rapporto $CD4^+CD8^-$ rispetto a $CD8^+CD4^-$ è circa 2:1.
Ig, immunoglobuline; MHC, complesso maggiore di istocompatibilità.

Le diverse classi di linfociti B e T presentano caratteristiche fenotipiche e funzionali specifiche. Le principali classi di linfociti B sono le cellule follicolari B, le cellule B delle zone marginali e le cellule B-1, Ognuna di queste risiede in una precisa sede anatomica all'interno dei diversi organi linfoidi. I linfociti B follicolari esprimono un repertorio di anticorpi altamente diversificato distribuiti in maniera clonale che agiscono come recettori per l'antigene e come molecole secrete effettrici dell'immunità umorale adattativa. Al contrario, i linfociti B-1 e quelli della zona marginale producono anticorpi dotati di una diversificazione più limitata.

Le due sottopopolazioni principali di linfociti T sono i linfociti T $CD4^+$ helper e i CTL $CD8^+$, che esprimono dei recettori per l'antigene chiamati recettori T (TCR) αβ e funzionano come mediatori dell'immunità cellulare. I linfociti $CD4^+$ regolatori rappresentano un terzo tipo di linfociti T che

esprime i recettori αβ; la loro funzione è di inibire le risposte immunitarie. Inoltre, le cellule NKT e i linfociti T γδ sono due sottopopolazioni numericamente minori di linfociti T che esprimono un TCR dotato di una diversificazione più limitata, in analogia con gli anticorpi prodotti dai linfociti B-1. Le funzioni di queste classi di linfociti B e T saranno discusse nei capitoli successivi.

L'espressione di varie proteine presenti sulla membrana cellulare può essere utilizzata per distinguere popolazioni linfocitarie funzionalmente diverse (vedi Tab. 2-2). Per esempio, la maggior parte dei linfociti T helper esprime una proteina chiamata CD4, mentre la maggior parte dei CTL esprime una proteina diversa denominata CD8. Queste e molte altre proteine sono spesso chiamate marcatori, in quanto consentono di identificare le diverse popolazioni cellulari. Tali marcatori, non solo definiscono differenti classi di linfociti, ma sono anche strutture funzionalmente attive, specifiche della cellula che le esprime. Il modo più comune per studiare l'espressione in membrana di un marcatore fenotipico si basa sull'utilizzo di anticorpi specifici. Gli anticorpi sono quindi usati sia dai ricercatori sia dai clinici come strumenti analitici importanti. Sono oggi disponibili centinaia di anticorpi monoclonali dotati di diversa specificità e marcati con sonde che permettono la loro rapida individuazione sulla superficie cellulare. (Gli anticorpi sono descritti nel Capitolo 5 e i metodi sperimentali relativi al loro utilizzo sono discussi nell'Appendice IV.) La nomenclatura CD (*Cluster of Differentiation* o gruppo di differenziazione) è universalmente usata per classificare le molecole di superficie che identificano un particolare stipite cellulare o un determinato stadio di differenziazione; le molecole CD hanno una struttura definita e sono riconosciute da un gruppo (*cluster*) di anticorpi monoclonali. Questo comporta che tutte le molecole che possiedono una struttura ben definita siano definite da un CD seguito da un numero (per esempio CD1, CD2). Sebbene originariamente utilizzati per definire le sottopopolazioni leucocitarie, i marcatori CD si trovano su tutti i tipi di cellule presenti nell'organismo. L'Appendice III fornisce la lista dei marcatori leucocitari CD menzionati in questo volume.

Maturazione dei linfociti

Dopo la nascita, come tutte le cellule ematopoietiche, anche i linfociti originano dalle cellule staminali presenti nel midollo osseo. L'origine midollare dei linfociti fu inizialmente dimostrata mediante esperimenti di "chimerismo" condotti in animali esposti a radiazioni ionizzanti. I linfociti e i loro precursori sono radiosensibili e sono uccisi da dosi elevate di raggi γ. Se un topo di un determinato ceppo viene irradiato e successivamente inoculato con precursori midollari o cellule staminali ematopoietiche purificate da un topo di ceppo diverso, è possibile osservare che tutti i linfociti che si sviluppano nell'animale irradiato derivano dalle cellule del donatore. Questo approccio sperimentale è estremamente utile per lo studio dei meccanismi di maturazione dei linfociti e di altre cellule ematopoietiche. Tutti i linfociti percorrono fasi di maturazione complesse durante le quali acquisiscono l'espressione dei recettori per l'antigene e le caratteristiche funzionali e fenotipiche proprie dei linfociti maturi.

I luoghi anatomici dove avvengono le fasi più importanti della maturazione sono chiamati *organi linfoidi generativi* o *primari*. Essi sono: il midollo osseo, dove originano i precursori di tutti i linfociti, e il timo, dove maturano i linfociti T (Fig. 2-5). Il processo di maturazione dei linfociti B e T sarà analizzato nel Capitolo 8. I linfociti T e B maturi sono definiti **linfociti naïve** (o vergini). I linfociti naïve sono quiescenti da un punto di vista funzionale; tuttavia, in seguito all'attivazione da parte di un antigene, essi proliferano e subiscono una serie di cambiamenti radicali nel fenotipo e nell'attività funzionale.

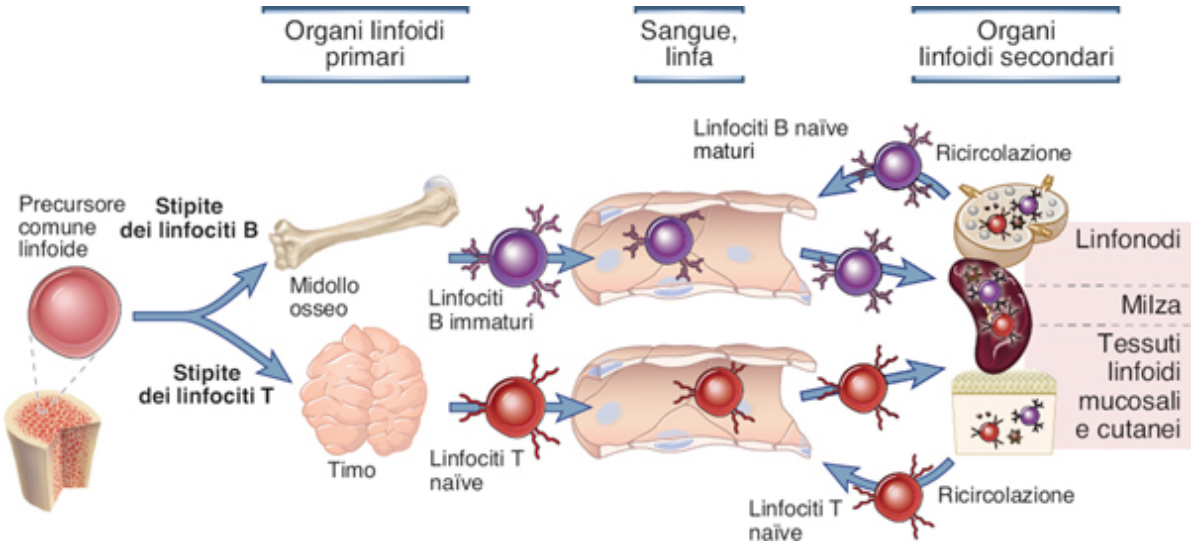
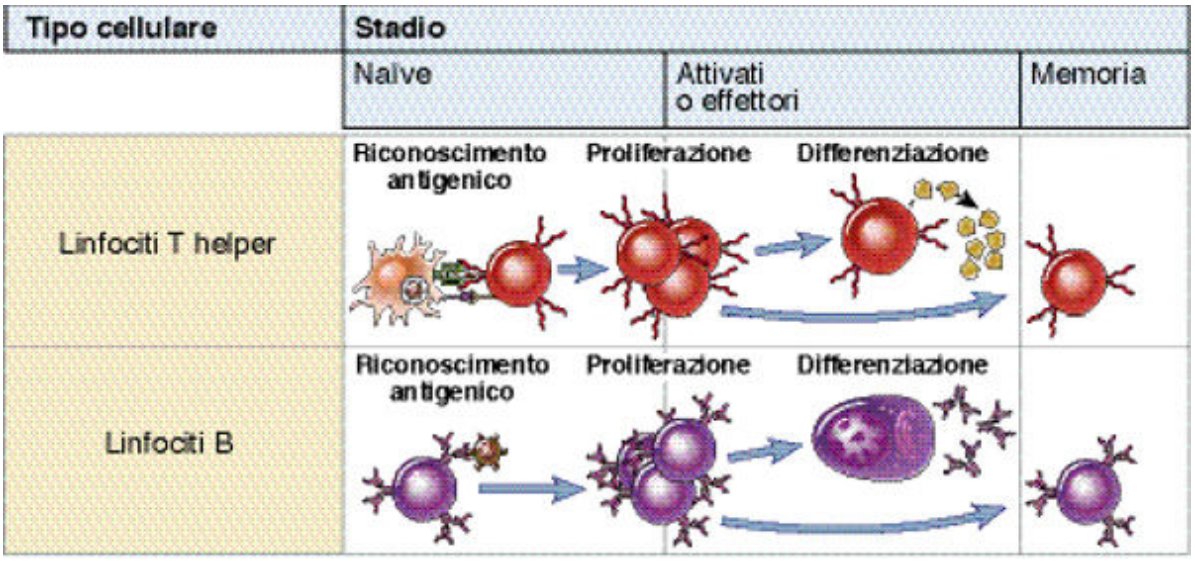


FIGURA 2-5 Maturazione dei linfociti. I linfociti derivano da una cellula staminale midollare, maturano negli organi linfoidi primari (il midollo per i linfociti B e il timo per i linfocti T) e successivamente raggiungono attraverso il sangue gli organi linfoidi secondari (linfonodi, milza e tessuti linfoidi regionali, come i tessuti linfoidi associati alle mucose). I linfociti T escono dal timo solo quando sono maturi, mentre i linfociti B escono dal midollo ancora immaturi e completano la loro maturazione negli organi linfoidi secondari. I linfociti naïve possono rispondere agli antigeni nei tessuti linfoidi secondari o ritornare con la linfa al sangue e ricircolare in altri organi linfoidi secondari.

Le popolazioni linfocitarie possono essere distinte in base alla loro precedente esposizione all'antigene

I linfociti naïve che fuoriescono dal midollo osseo o dal timo migrano agli organi linfoidi secondari, dove sono attivati dagli antigeni e vengono indotti a proliferare e differenziarsi in cellule effettrici e della memoria; successivamente, alcune di queste cellule migreranno nei tessuti periferici (Fig. 2-6 e Tab. 2-3). L'attivazione dei linfociti avviene per tappe successive e inizia con la sintesi di nuove proteine, come le citochine e i loro recettori, proteine che sono necessarie per molti dei cambiamenti che avverranno successivamente. In seguito, i linfociti naïve proliferano per espandere i cloni specifici per l'antigene; questo processo è definito **espansione clonale**. Durante alcune infezioni microbiche, il numero dei linfociti T, specifici per l'agente, può aumentare fino a 50.000 volte, mentre i linfociti B specifici possono aumentare più di 5.000 volte. La rapida espansione clonale dei linfociti antigene-specifici è necessaria per fronteggiare la capacità dei microbi di proliferare velocemente. Contemporaneamente all'espansione clonale, i linfociti stimolati dall'antigene si differenziano in **cellule effettrici** capaci di eliminare l'antigene. Altri linfociti B e T attivati si differenziano in **cellule della memoria**, dotate di lunga sopravvivenza e in grado di garantire risposte rapide ed efficaci in caso di un successivo incontro con lo stesso antigene (risposta secondaria). Quindi, una popolazione mista di linfociti è presente nei diversi siti anatomici e le diverse cellule possono essere distinte sulla base del fenotipo e delle loro funzioni (Tab. 2-3).

TABELLA 2-3 Caratteristiche dei linfociti naïve, effettori e della memoria



	Naïve	Attivati o effettori	Memoria
Linfociti T			
Migrazione	Preferenzialmente negli organi linfoidi secondari	Preferenzialmente nei tessuti infiammati	Preferenzialmente nei tessuti infiammati, nei tessuti associati alle mucose
Frequenza di cellule che rispondono a un particolare antigene	Molto bassa	Elevata	Bassa
Funzioni effettrici	Nessuna	Secrezione di citochine; attività citotossica	Nessuna
Proliferazione	No	Sì	+/–
Espressione di proteine di membrana			
IL-2R (CD25)	Bassa	Elevata	Bassa
L-selectina (CD62L)	Elevata	Bassa	Variabile
IL-7R (CD127)	Moderatamente elevata	Bassa	Elevata
Molecole di adesione: integrine, CD44	Bassa	Elevata	Elevata
Recettore per le chemochine: CCR7	Elevata	Bassa	Variabile
Principale isoforma del CD45 (solo nell'uomo)	CD45RA	CD45RO	CD45RO; variabile
Morfologia	Piccoli; scarso citoplasma	Grandi; citoplasma abbondante	Piccoli

Linfociti B			
Isotipo delle immunoglobuline (Ig) di membrana	IgM e IgD	Frequentemente IgG, IgA, IgE	Frequentemente IgG, IgA, IgE
Affinità delle Ig prodotte	Relativamente bassa	Aumenta durante la risposta immunitaria	Relativamente elevata
Funzione effettrice	Nessuna	Secrezione di anticorpi	Nessuna
Morfologia	Piccoli; scarso citoplasma	Grandi; abbondante citoplasma; plasmacellula	Piccoli
Espressione di proteine di membrana			
Recettore per le chemochine CXCR5	Elevata	Bassa	?
CD27	Bassa	Elevata	Elevata

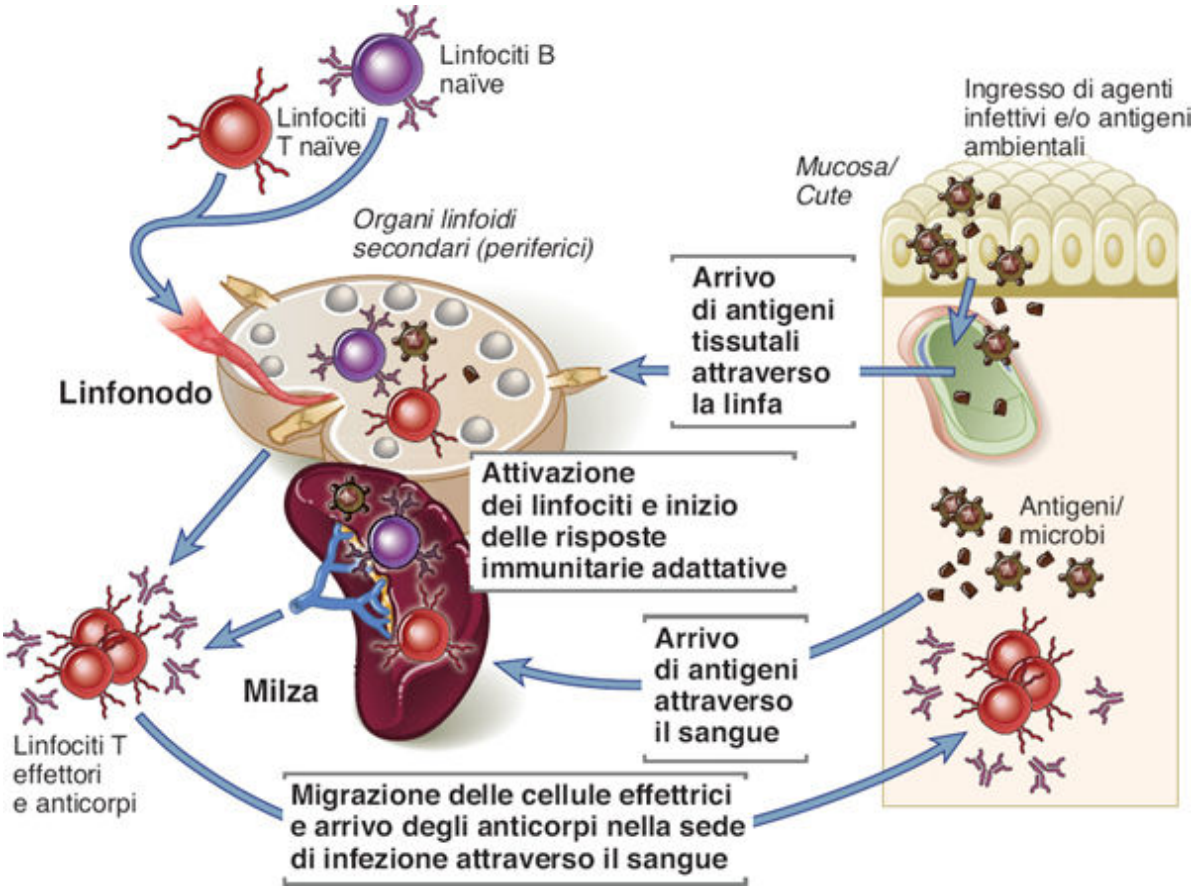


FIGURA 2-6 Fasi del processo di attivazione dei linfociti. I linfociti T naïve che escono dal timo e i linfociti B immaturi che escono dal midollo osseo migrano verso gli organi linfoidi secondari, quali i linfonodi e la milza. Qui i linfociti B completano la loro maturazione e i linfociti B e T naïve attivati dagli antigeni si differenziano in linfociti effettori e della memoria. Alcuni linfociti effettori e della memoria migrano ai siti di infezione nei tessuti periferici. Gli anticorpi secreti nei linfonodi dai linfociti B effettori, nella milza e nel midollo osseo (non mostrato in figura) entrano nel sangue e arrivano ai siti di infezione.

In seguito verranno dettagliatamente descritti i meccanismi molecolari responsabili dell'attivazione e della differenziazione dei linfociti nelle varie popolazioni funzionali. Qui riassumiamo le caratteristiche fenotipiche di ognuna di queste popolazioni.

Linfociti naïve

I linfociti naïve (o vergini) sono linfociti T o B, presenti in circolo e negli organi linfoidi secondari, che non hanno mai incontrato l'antigene. (Il termine *naïve* indica che queste cellule sono immunologicamente inesperte, perché non hanno ancora incontrato un antigene.) In assenza del

riconoscimento dell'antigene, i linfociti naïve muoiono nell'arco di 1-3 mesi. Sia i linfociti naïve sia quelli della memoria sono chiamati linfociti a riposo (*resting*) perché non proliferano e non svolgono funzioni effettrici. I linfociti T e B naïve (e della memoria) non sono distinguibili morfologicamente e sono spesso chiamati *linfociti piccoli*, per come appaiono tramite l'osservazione di una goccia di sangue al microscopio o analisi con citometria a flusso. Un linfocita piccolo ha un diametro di 8-10 μm, un grande nucleo con eterocromatina densa e un sottile anello di citoplasma che contiene pochi mitocondri, ribosomi e lisosomi, ma dove non si distinguono organuli specializzati (Fig. 2-7). Prima di essere stimolati, i linfociti naïve sono in uno stato quiescente o stadio G_0 del ciclo cellulare. In seguito a stimolazione, passano allo stadio G_1, per poi dividersi. I linfociti attivati sono più grandi (10-12 μm di diametro) e hanno un citoplasma più abbondante caratterizzato da una maggiore presenza di organuli e da un'aumentata quantità di RNA citoplasmatico. Queste cellule vengono chiamate linfociti grandi o linfoblasti (vedi Fig. 2-7).

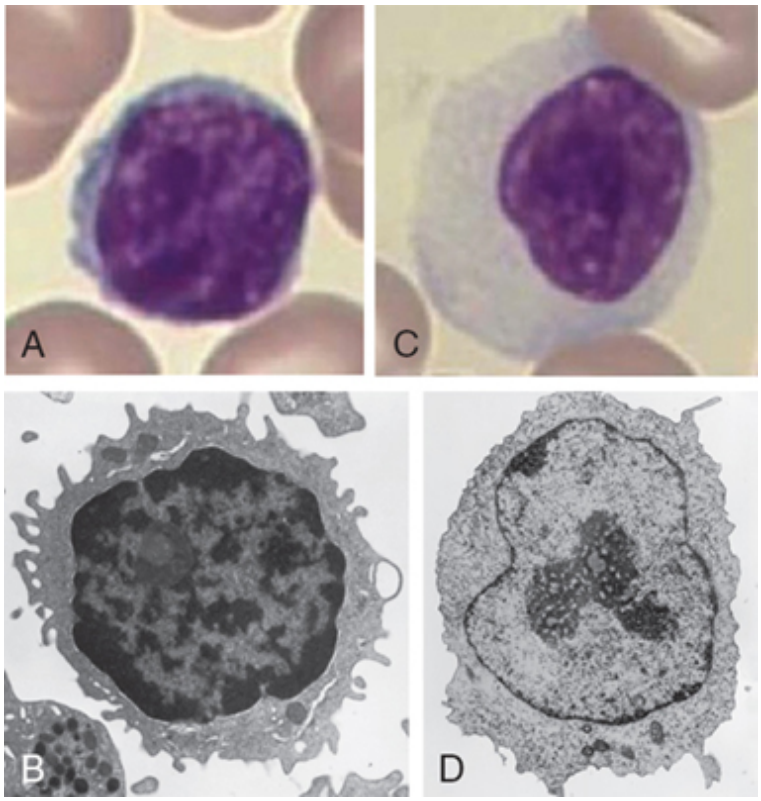


FIGURA 2-7 Morfologia dei linfociti. A. Fotografia ottenuta al microscopio ottico di un linfocita presente in uno striscio di sangue periferico. (*Per gentile concessione del Dr. Jean Shafer, Department of Pathology, University of California, San Diego. Copyright © 1995-2008, Carden Jennings Publishing Co. Ltd.*) **B.** Fotografia ottenuta al microscopio elettronico di un piccolo linfocita. (*Per gentile concessione del Dr. Noel Weidner, Department of Pathology, University of California, San Diego.*) **C.** Fotografia ottenuta al microscopio ottico di un grande linfocita (linfoblasto). (*Per gentile concessione del Dr. Jean Shafer, Department of Pathology, University of California, San Diego. Copyright © 1995-2008, Carden Jennings Publishing Co. Ltd.*). **D.** Fotografia ottenuta al microscopio elettronico di un grande linfocita (linfoblasto). (*Da Fawcett DW: Bloom and Fawcett: a textbook of histology, 12th ed, New York, 1994, Chapman & Hall. Per gentile concessione di Springer Science and Business Media.*)

La sopravvivenza dei linfociti naïve dipende da segnali che si originano in seguito alla stimolazione del recettore per l'antigene e alla presenza di citochine. Si pensa che il recettore per l'antigene dei linfociti B naïve invii segnali di sopravvivenza anche in assenza dell'antigene, mentre si ritiene che i linfociti T naïve riconoscano antigeni self in un modo sufficientemente debole da dare segnali di sopravvivenza senza indurre l'espansione clonale e la differenziazione in cellule effettrici. L'importanza dell'espressione del recettore per l'antigene per la sopravvivenza del pool di linfociti naïve negli organi linfoidi secondari è stata dimostrata in studi condotti su topi, in cui i geni che codificano per i recettori dell'antigene dei linfociti B e T venivano eliminati subito dopo la maturazione cellulare. Questi studi hanno dimostrato che i linfociti che perdevano il recettore morivano entro 2-3 settimane.

Anche le citochine, i cui recettori sono espressi dai linfociti T e B naïve, sono indispensabili per la sopravvivenza di queste cellule. Le più importanti sono l'IL-7, che permette la sopravvivenza e forse anche una lenta replicazione dei linfociti T naïve, e il fattore di attivazione dei linfociti B (*B Cell Activating Factor*, BAFF), una citochina appartenente alla famiglia del fattore di necrosi tumorale (*Tumor Necrosis Factor*, TNF), necessario per la loro sopravvivenza.

In condizioni fisiologiche il pool dei linfociti naïve resta numericamente costante, come risultato dell'equilibrio tra la morte spontanea e la produzione di nuove cellule negli organi linfoidi primari. La diminuzione del numero dei linfociti induce una proliferazione di quelli rimasti e il loro rilascio dagli organi linfoidi primari, in modo da compensare le cellule eliminate. Una dimostrazione della capacità dei linfociti di riempire lo spazio disponibile è il fenomeno della proliferazione omeostatica. Se i linfociti naïve vengono trasferiti in un ospite privo di linfociti (detto

linfopenico), i linfociti trasferiti cominciano a proliferare finché raggiungono il numero presente negli animali normali. Questo processo si verifica in clinica nel trapianto di cellule staminali ematopoietiche per il trattamento di alcuni tipi di neoplasie maligne e di malattie genetiche.

Sembra che la proliferazione omeostatica sia controllata dagli stessi segnali necessari per la sopravvivenza dei linfociti naïve, cioè debole riconoscimento di antigeni self e citochine, soprattutto IL-7.

Linfociti effettori

Quando i linfociti naïve si attivano, aumentano di dimensione e iniziano a proliferare. Alcune di queste cellule si differenziano in linfociti effettori, in grado di produrre molecole che eliminano gli antigeni. I linfociti T effettori includono i lifnociti T helper e i CTL, mentre i linfociti B effettori sono cellule che producono gli anticorpi, quali le plasmacellule. I linfociti T helper, che sono $CD4^+$, esprimono molecole, come il ligando di CD40 (CD154) e secernono citochine che si legano ai recettori espressi dai macrofagi e dai linfociti B. I CTL presentano nel citoplasma granuli contenenti proteine che vengono rilasciate per uccidere cellule infettate da virus e cellule tumorali. Le cellule effettrici, sia $CD4^+$ sia $CD8^+$, esprimono sulla loro superficie molecole che indicano una loro attivazione recente, come il CD25 (una catena del recettore per l'IL-2, il fattore di crescita dei linfociti T) e un profilo diverso di molecole di adesione (selectine e integrine, discusse nel Capitolo 3). La maggior parte dei linfociti T effettori differenziati ha vita breve e non si replica.

Molti linfociti B che secernono anticorpi sono morfologicamente identificabili come **plasmacellule**. Queste cellule hanno nuclei caratteristici, localizzati in posizione eccentrica, con la cromatina distribuita intorno alla membrana nucleare con un pattern a ruota di carro, abbondante citoplasma con denso reticolo endoplasmatico rugoso, che è il luogo dove sono sintetizzati gli anticorpi (e le altre proteine secrete o di membrana) e un apparato di Golgi ben definito in posizione perinucleare, dove gli anticorpi sono preparati nella loro forma finale e assemblati per la secrezione (Fig. 2-8). È stato valutato che metà o più dell'RNA messaggero contenuto in queste cellule codifichi per molecole anticorpali e che una singola plasmacellula possa secernere migliaia di molecole anticorpali al secondo. Le

plasmacellule si sviluppano negli organi linfoidi e nei siti dove si attivano le risposte immunitarie per poi migrare nel midollo osseo, dove possono sopravvivere per lunghi periodi anche quando la risposta immunitaria è terminata e l'antigene è stato eliminato.

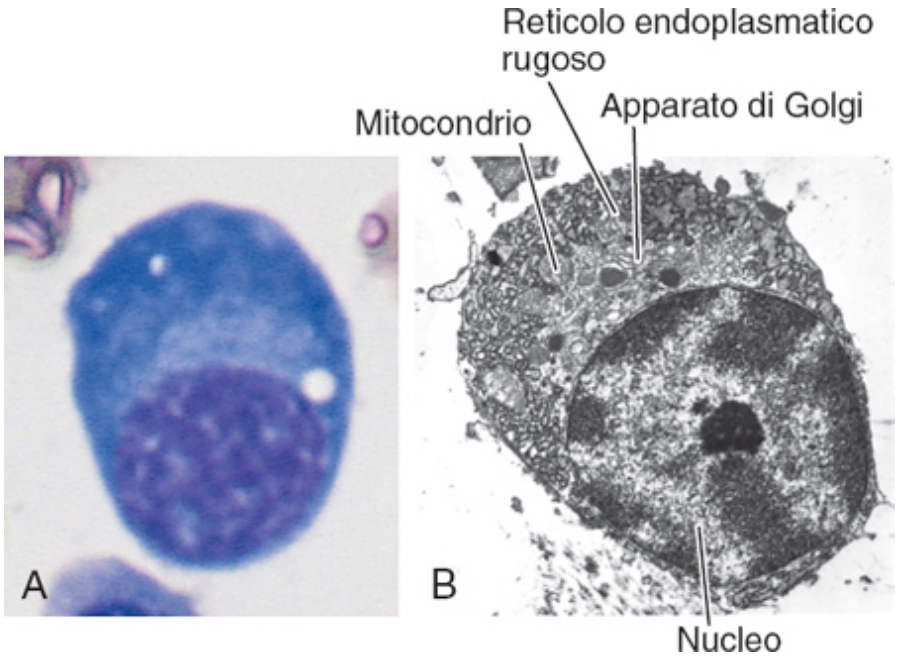


FIGURA 2-8 Morfologia delle plasmacellule. A. Fotografia ottenuta al microscopio ottico di una plasmacellula in un tessuto. **B.** Fotografia ottenuta al microscopio elettronico di una plasmacellula. (*Per gentile concessione del Dr. Noel Weidner, Department of Pathology, University of California, San Diego, California.)*

Linfociti della memoria

Le cellule della memoria possono sopravvivere in uno stato di quiescenza o replicarsi molto lentamente per molti anni anche dopo che l'antigene è stato eliminato. Queste cellule possono essere identificate in base all'espressione di proteine di membrana che le distinguono dai linfociti naïve e dai linfociti effettori di recente attivazione; tuttavia, non è ancora del tutto chiaro quali di queste proteine rappresentino marcatori univoci di tali cellule (vedi Tab. 2-3). I linfociti T della memoria e i naïve, ma non gli effettori, esprimono livelli elevati del recettore per l'IL-7 (CD127). I linfociti T della memoria esprimono anche molecole di superficie che permettono la loro migrazione nei siti di infezione (vedi Cap. 3). Nell'uomo, la maggior parte dei linfociti T naïve esprime un'isoforma di 200 kD di una molecola di membrana detta

CD45, di cui una parte è codificata da un esone chiamato A e viene perciò chiamata CD45RA (dove RA sta per *Restricted A*). Per contro, la maggior parte dei linfociti T attivati e della memoria esprime un'isoforma di 180 kD di CD45, in cui l'RNA dell'esone A è stato eliminato mediante splicing alternativo; questa forma è chiamata CD45RO. Questo modo di distinguere i linfociti T della memoria da quelli naïve non è comunque assoluto, in quanto sono state descritte popolazioni $CD45RA^+$ che acquisiscono un fenotipo $CD45RO^+$ e viceversa.

I linfociti B della memoria possono esprimere diverse classi (isotipi) di Ig di membrana, come le IgG, le IgE o le IgA, come conseguenza della mutazione isotipica, laddove le cellule naïve esprimono soltanto IgM e IgD (vedi Capp. 5 e 12). Nell'uomo, l'espressione di CD27 rappresenta un marcatore per i linfociti B della memoria.

Le cellule della memoria sono eterogenee e possono essere distinte diverse sottopopolazioni in base alla loro localizzazione e alle caratteristiche migratorie. Nei Capitoli 9 e 12 parleremo dei linfociti T e B della memoria.

Le caratteristiche che distinguono i linfociti naïve, effettori e della memoria dipendono dai differenti programmi di espressione genica, regolati da fattori di trascrizione e da modifiche epigenetiche stabili, come la metilazione e l'acetilazione dell'istone e il rimodellamento della cromatina. Per esempio un fattore di trascrizione chiamato *fattore 2 Kruppel-like* (KLF-2) è necessario per mantenere il fenotipo naïve dei linfociti T. I fenotipi di sottopopolazioni funzionali dei linfociti T $CD4^+$, detti T_H1, T_H2 e T_H17, dipendono rispettivamente dai fattori di trascrizione T-bet, GATA-3 e RORγT, ma anche da modificazioni epigenetiche dei loci genici di alcune citochine (vedi Cap. 9). Altri fattori trascrizionali sono necessari per mantenere i fenotipi dei linfociti T e B della memoria. La nostra comprensione dei fattori responsabili del fenotipo linfocitario è tutt'ora incompleta e in fase di evoluzione.

Cellule linfoidi innate

Le cellule linfoidi innate (ILC) includono numerosi sottopopolazioni di cellule che derivano dal midollo osseo e sono correlate dal punto di vista dello sviluppo; esse presentano una morfologia cellulare e funzioni effettrici simili a quelle dei linfociti T, ma non esprimono il recettore per

l'antigene caratteristico dei linfociti T. Le funzioni principali delle ILC sono quelle di agire come prima linea di difesa contro gli agenti infettivi patogeni, di riconoscere e eliminare le cellule dell'ospite stressate e danneggiate e di influenzare la natura delle risposte adattative.

Le prime cellule linfoidi innate meglio caratterizzate sono le cellule natural killer (NK), che uccidono le cellule infettate e danneggiate e secernono la citochina IFNγ, prodotta anche dalla sottopopolazione T_H1 dei linfociti T $CD4^+$ effettori. Descriveremo le cellule NK in maggior dettaglio nel Capitolo 4. Altre sottopopolazioni di cellule linfoidi innate secernono citochine che sono prodotte anche da alcuni tipi di linfociti T helper $CD4^+$, quali l'IL-5, IL-13, IL-17 e IL-22.

Le funzioni di queste citochine sono descritte nel Capitolo 10, in cui discuteremo le funzioni effettrici dei linfociti T $CD4^+$. Le cellule induttrici del tessuto linfoide sono una sottopopolazione di ILC, producono citochine quali la linfotossina e il TNF e sono essenziali per la formazione del tessuto linfoide secondario organizzato, descritto più avanti in questo capitolo.

ANATOMIA E FUNZIONI DEI TESSUTI LINFOIDI

Allo scopo di ottimizzare le interazioni cellulari necessarie per il riconoscimento degli antigeni e l'attivazione delle risposte immunitarie adattative, i linfociti e le APC si localizzano preferenzialmente in tessuti o in organi anatomicamente definiti, in cui vengono anche trasportati e concentrati gli antigeni. Questa compartimentalizzazione anatomica non è rigida poiché, come sarà discusso nel Capitolo 3, molti linfociti continuano a ricircolare dal torrente ematico ai tessuti.

I tessuti linfoidi vengono classificati in organi linfoidi generativi (o primari o centrali), dove i linfociti acquisiscono la capacità di esprimere i recettori per l'antigene e raggiungono la maturità fenotipica e funzionale, e in organi linfoidi secondari, detti anche organi linfoidi periferici, in cui hanno inizio e si sviluppano le risposte agli antigeni (vedi Fig. 2-5). Gli organi linfoidi primari dei mammiferi sono il midollo osseo e il timo, sede di maturazione rispettivamente dei linfociti B e T. I linfociti B iniziano a

maturare nel midollo osseo, per poi andare a localizzarsi attraverso il circolo ematico negli organi linfoidi secondari, quali i linfonodi e soprattutto la milza, dove completano la loro maturazione. I linfociti T compiono il processo di maturazione nel timo, per poi entrare in circolo e localizzarsi negli organi linfoidi secondari e nei tessuti. Gli organi linfoidi primari hanno in comune due funzioni importanti, ovvero fornire fattori di crescita e altri segnali necessari alla maturazione dei linfociti e presentare loro gli antigeni self per il riconoscimento e la selezione dei linfociti in corso di maturazione (vedi Cap. 8).

Gli organi e i tessuti linfoidi secondari comprendono i linfonodi, la milza, il sistema immunitario cutaneo e il sistema immunitario associato alle mucose. Inoltre, nel tessuto connettivo e nella maggior parte degli organi, sono presenti aggregati linfocitari scarsamente definiti. Tutti gli organi linfoidi secondari svolgono funzioni comuni tra cui la co-localizzazione degli antigeni e dei linfociti naïve, per favorire l'inizio delle risposte adattative e un'organizzazione anatomica che consente ai linfociti B e T di interagire e cooperare.

Midollo osseo

Il midollo osseo è l'organo in cui viene prodotta la maggior parte delle cellule che circolano nel sangue, compresi i globuli rossi, i granulociti e i monociti, e in cui avvengono i primi stadi della maturazione dei linfociti B. Durante lo sviluppo fetale, la produzione delle cellule ematopoietiche, processo chiamato **ematopoiesi** (Fig. 2-9), avviene inizialmente nelle isole ematiche del sacco vitellino e nel mesenchima paraortico, successivamente, tra il terzo e il quarto mese di gestazione, nel fegato, e infine nel midollo osseo. Alla nascita l'ematopoiesi avviene soprattutto nelle ossa, specialmente nel midollo osseo delle ossa piatte, e nella pubertà l'ematopoiesi si realizza principalmente nello sterno, nelle vertebre, nelle ossa iliache e nelle costole. Il midollo rosso che si trova all'interno di queste ossa consiste di un'intelaiatura reticolare spugnosa localizzata tra lunghe trabecole ossee. Gli spazi di tale intelaiatura contengono una rete di vasi sanguigni sinusoidi tappezzati da cellule endoteliali attaccate a una membrana basale discontinua. All'esterno dei sinusoidi si trovano aggregati di precursori ematici, a vari stadi di sviluppo, e adipociti maturi. I precursori

ematici maturano e migrano attraverso la membrana basale dei sinusoidi e tra le cellule endoteliali per entrare nel circolo sanguigno. In presenza di una lesione del midollo osseo o di un fabbisogno eccezionale di nuove cellule ematiche, il fegato e la milza possono diventano sede di ematopoiesi extramidollare.

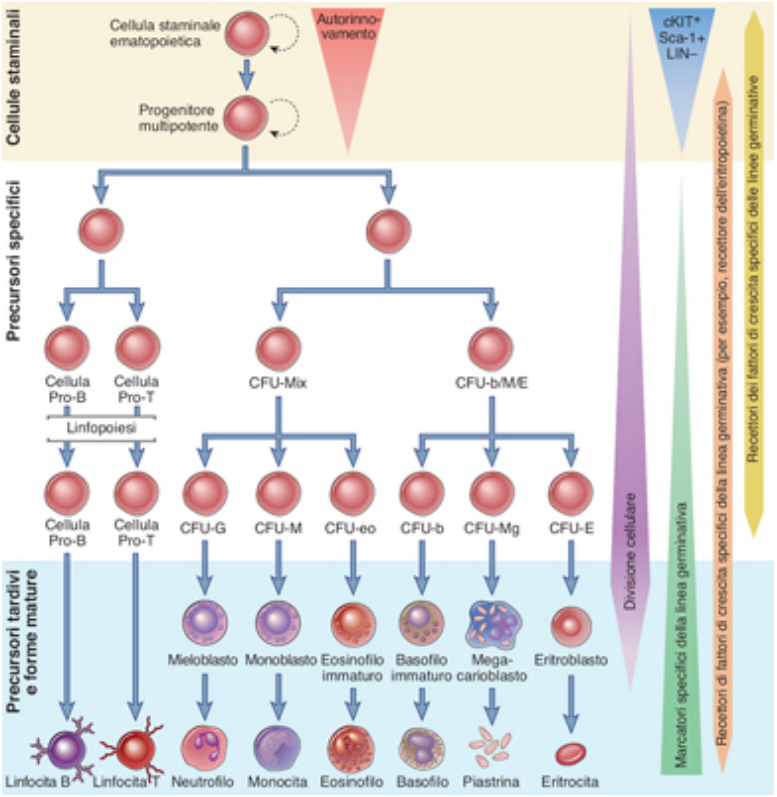


FIGURA 2-9 Ematopoiesi. In questo albero emopoietico è illustrato lo sviluppo delle principali linee germinative delle cellule ematopoietiche. Le principali citochine che guidano la maturazione delle differenti linee sono descritte nella Tabella 2-4. Lo sviluppo dei linfociti è descritto più avanti in questo capitolo e nella Figura 8-2. Anche la maggior parte delle cellule dendritiche deriva dallo stesso precursore mieloide comune da cui derivano i monociti (non mostrato in figura). Anche i mastociti, le cellule NK e altre cellule linfoidi innate (non mostrate in figura) derivano da progenitori specifici nel midollo osseo.

TABELLA 2-4 Citochine ematopoietiche

Citochina	Dimensioni	Principale sorgente cellulare	Principali cellule immature bersaglio	Principali popolazioni di cui induce la maturazione
Fattore delle cellule staminali (ligando di c-Kit)	24 kD	Cellule stromali del midollo osseo	Cellule ematopoietiche	Tutte

Interleuchina-7 (IL-7)	25 kD	Fibroblasti, cellule stromali del midollo osseo	Progenitori linfoidi immaturi	Linfociti T
Interleuchina-3 (IL-3)	20-26 kD	Linfociti T	Progenitori immaturi	Tutte
CSF dei granulocitimonociti (GM-CSF)	18-22 kD	Linfociti T, macrofagi, cellule endoteliali, fibroblasti	Progenitori mieloidi immaturi e già destinati a stipiti cellulari specifici, macrofagi maturi	Granulociti e monociti, attivazione macrofagica
CSF dei monociti (M-CSF)	Dimero di 70-90 kD; subunità di 40-kD	Macrofagi, cellule endoteliali, cellule del midollo osseo, fibroblasti	Progenitori già indirizzati	Monociti
CSF dei granulociti (G-CSF)	19 kD	Macrofagi, fibroblasti, cellule endoteliali	Progenitori dei granulociti già indirizzati	Granulociti
Ligando Flt-3	30 kD	Cellule stromali del midollo osseo	Cellule staminali ematopoietiche, progenitori delle cellule dendritiche e delle cellule B	Cellule dendritiche classiche e plasmacitoidi, cellule B

I globuli rossi, i granulociti, i monociti, le cellule dendritiche, le piastrine, i linfociti B e T e le cellule NK originano tutti da una cellula staminale ematopoietica comune midollare (vedi Fig. 2-9). Le cellule staminali ematopoietiche (*Hematopoietic Stem Cells*, HSC) sono cellule pluripotenti, cioè in grado di generare ogni tipo di cellula matura del sangue. Le HSC hanno anche il potere di autorinnovarsi, dal momento che ogni volta che si dividono, almeno una cellula figlia mantiene le proprietà della cellula staminale, mentre l'altra può differenziare lungo una particolare linea (divisione asimmetrica). Le HSC possono essere identificate grazie alla presenza di marcatori di superficie, quali le proteine CD34 e c-Kit, e dall'assenza dei marcatori specifici di differenziazione che sono espressi dalle cellule mature. Le HSC si localizzano in microscopiche nicchie specializzate del midollo osseo. Qui le cellule stromali non ematopoietiche forniscono segnali, tramite contatto cellulare e fattori solubili, necessari per mantenere il ciclo replicativo delle HSC. Le HSC danno origine a due tipi di progenitori cellulari multipotenti, uno che genera cellule linfoidi e alcune

cellule mieloidi e un altro che produce cellule mieloidi, eritrociti e piastrine. Il progenitore mieloide-linfoide comune dà origine a precursori specifici dei linfociti T, B o appartenenti alla linea germinale delle cellule linfoidi innate, così come alcune cellule mieloidi. I progenitori comuni mieloidi-megacariocitici-eritroidi danno invece origine a precursori della linea eritroide, megacariocitica, granulocitica e monocitica, per generare rispettivamente globuli rossi maturi, piastrine, granulociti (neutrofili, eosinofili, basofili) e monociti. La maggior parte delle cellule dendritiche ha origine dalla linea monocitica.

La proliferazione e la maturazione dei precursori midollari sono stimolate dall'azione di citochine, che generalmente prendono il nome di **fattori di stimolazione della crescita delle colonie** (*Colony Stimulating Factor*, CSF) perché originariamente furono identificate sulla base della loro capacità di stimolare la crescita e lo sviluppo di colonie leucocitarie o eritroidi dal midollo osseo. Nel midollo osseo, le citochine ematopoietiche sono prodotte dalle cellule stromali e dai macrofagi, che contribuiscono a formare il microambiente adatto all'ematopoiesi. Tali citochine vengono prodotte anche dai linfociti T stimolati dall'antigene e da macrofagi attivati da citochine o microbi; questo meccanismo garantisce il rifornimento dei leucociti necessario a ripristinare le perdite che possono avvenire durante le reazioni immunitarie e infiammatorie. I nomi e le caratteristiche delle principali citochine ematopoietiche sono elencati nella Tabella 2-4.

Oltre alle cellule staminali, dotate della capacità di autorinnovarsi, e alla loro progenie che va incontro a differenziazione, il midollo osseo contiene numerose plasmacellule a lunga sopravvivenza che si sono generate nei tessuti linfoidi secondari in seguito alla stimolazione dei linfociti B e sono successivamente migrate nel midollo. Il midollo contiene inoltre cellule B follicolari ricircolanti che in questa sede possono riconoscere i microbi presenti nel sangue.

Anche alcuni linfociti T della memoria a lunga sopravvivenza migrano e risiedono nel midollo osseo.

Timo

Il timo è la sede dove avviene la maturazione dei linfociti T. Il timo è un organo bilobato situato nel mediastino anteriore. Ogni lobo è suddiviso da

setti fibrosi in molteplici lobuli e ogni lobulo è formato da una regione corticale esterna e una midollare interna (Fig. 2-10). La regione corticale contiene un denso agglomerato di linfociti T, mentre quella midollare, meno intensamente colorata, è meno densamente popolata dai linfociti. I macrofagi e le cellule dendritiche si trovano quasi esclusivamente nella regione midollare. Disseminate in tutto il timo vi sono cellule non linfoidi di tipo epiteliale, dotate di un citoplasma abbondante. Le **cellule epiteliali della corticale timica** producono l'IL-7, una citochina necessaria per lo sviluppo iniziale dei linfociti T. Nella regione midollare si trova una sottopopolazione specializzata di cellule epiteliali, chiamate **cellule epiteliali midollari timiche** (*Medullary Thymic Epithelial Cells*, MTEC), che hanno un ruolo speciale nella presentazione degli antigeni self ai linfociti T in corso di maturazione nell'ambito dei processi di selezione. Questo rappresenta uno dei meccanismi che assicurano che il sistema immunitario sia tollerante agli antigeni self, come sarà discusso in dettaglio nel Capitolo 15. Nella regione midollare vi sono strutture, denominate corpuscoli di Hassall, formate da spirali di cellule epiteliali strettamente impacchettate e rappresentano probabilmente residui di cellule in via di degenerazione. Il timo possiede una ricca rete vascolare e vasi linfatici efferenti che confluiscono nei linfonodi mediastinici. La componente epiteliale timica deriva da invaginazioni dell'ectoderma che avvengono a livello embrionale durante lo sviluppo del collo e del torace, con la formazione di strutture denominate tasche branchiali. Le cellule dendritiche, i macrofagi e i precursori dei linfociti derivano dal midollo osseo.

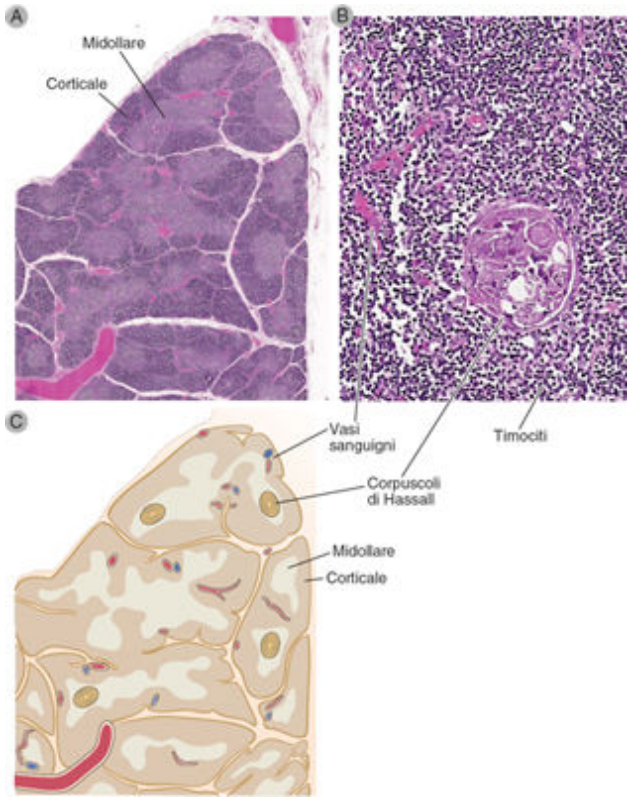


FIGURA 2-10 Morfologia del timo. A. Fotografia a piccolo ingrandimento ottenuta al microscopio ottico di un lobo timico. È evidente la colorazione più intensa della corteccia e quella meno intensa della regione midollare. **B.** Fotografia al microscopio ottico della midollare timica ottenuta a maggiore ingrandimento. Le numerose piccole cellule colorate in *blu* sono i linfociti T che si stanno sviluppando, chiamati timociti, mentre la struttura più grande, colorata in rosa, è un corpuscolo di Hassall, caratteristico della midollare, le cui funzioni sono però poco note. **C.** Raffigurazione schematica del timo che mette in evidenza una porzione di un lobo suddiviso in molteplici lobuli da trabecole fibrose.

Gli individui affetti dalla sindrome DiGeorge presentano un deficit di linfociti T dovuto a una delezione cromosomica che elimina i geni necessari per lo sviluppo del timo. Nel ceppo di topi “nudi”, che è stato molto usato nella ricerca immunologica, la mutazione di un gene per un fattore trascrizionale, provoca la mancata differenziazione di alcuni tipi di cellule epiteliali necessari per lo sviluppo del timo e dei follicoli piliferi. Di conseguenza, questi topi sono privi di linfociti T e di pelo.

I linfociti presenti nel timo, detti anche **timociti**, sono linfociti T a vari stadi maturativi. Le cellule più immature penetrano nel timo e il loro processo di maturazione ha inizio nella regione corticale. La successiva maturazione inizia nella regione corticale e a mano a mano che i timociti maturano migrano nella regione midollare, dove sono principalmente

presenti cellule mature. Solo i linfociti T naïve maturi escono dal timo ed entrano nel sangue e nei tessuti linfoidi secondari. La maturazione dei timociti sarà descritta in dettaglio nel Capitolo 8.

Sistema linfatico

Il sistema linfatico è essenziale per l'omeostasi dei fluidi tissutali e per le risposte immunitarie. Consiste di vasi specializzati che drenano i liquidi dai tessuti ai linfonodi e dai linfonodi al sangue (Fig. 2-11). Il fluido interstiziale si forma costantemente in tutti i tessuti vascolarizzati dal plasma che filtra dai capillari; la velocità della sua formazione locale può aumentare enormemente quando il tessuto è danneggiato o infettato. La cute, gli epiteli e gli organi parenchimatosi contengono numerosi capillari linfatici che assorbono e drenano il fluido interstiziale. I capillari linfatici sono vasi a fondo cieco tappezzati di cellule endoteliali parzialmente sovrapposte tra loro, prive di giunzioni intercellulari strette e senza membrana basale, caratteristiche tipiche dei vasi sanguigni. Questi capillari linfatici consentono che il liquido interstiziale entri liberamente nel vaso e la sovrapposizione delle cellule endoteliali e le valvole interne ai vasi, che permettono il flusso in una sola direzione, ne impediscono il riflusso. Una volta assorbito, il fluido interstiziale, chiamato **linfa**, scorre nei capillari linfatici, convergendo in vasi progressivamente più ampi, per effetto della contrazione delle cellule muscolari lisce perilinfatiche e della pressione prodotta dai movimenti dei tessuti muscoloscheletrici. Questi vasi confluiscono nei vasi linfatici afferenti che portano ai linfonodi la linfa, la quale poi esce attraverso i vasi linfatici efferenti. I vasi linfatici collegano tra loro una serie di linfonodi successivi, perciò un vaso linfatico efferente costituisce il vaso afferente del linfonodo successivo. Alla fine di una catena di linfonodi, il vaso linfatico efferente si unisce ad altri vasi linfatici, per poi confluire in un vaso linfatico di grandi dimensioni, detto dotto toracico. Dal dotto toracico, la linfa si riversa nella vena cava superiore, ritornando così al torrente circolatorio. I vasi linfatici della parte alta destra del tronco, del braccio destro e della parte destra della testa portano la linfa nel dotto linfatico destro, che si versa nella vena cava superiore. Ogni giorno rientrano in circolo circa 2 litri di linfa; il malfunzionamento del sistema linfatico dovuto alla presenza di tumori o ad

alcune infezioni parassitarie può portare alla formazione di gravi edemi tissutali.

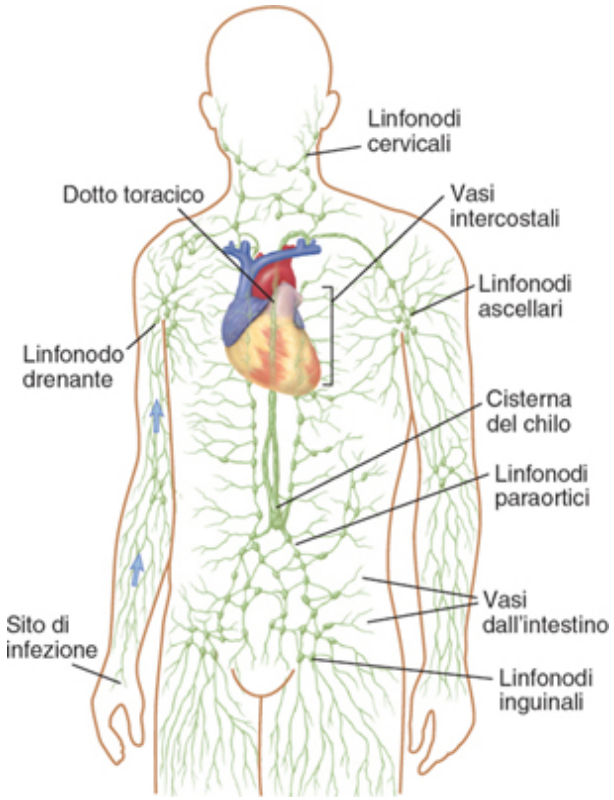


FIGURA 2-11 Sistema linfatico. La figura mostra i principali vasi linfatici, che si versano nella vena cava inferiore e superiore (non mostrate in figura), e le principali stazioni linfonodali. Gli antigeni sono catturati da un sito di infezione e trasportati al linfonodo drenante, dove daranno inizio alla risposta immunitaria.

Il sistema linfatico svolge la funzione di raccogliere gli antigeni microbici dal loro sito di ingresso nell'organismo e di portarli ai linfonodi, dove possono attivare la risposta adattativa. Spesso i microbi entrano nell'organismo attraverso la cute e i tratti gastrointestinale e respiratorio. Tutti questi tessuti sono ricoperti da epiteli, dove risiedono le cellule dendritiche, e sono drenati dai vasi linfatici. Le cellule dendritiche sono in grado di catturare antigeni microbici e di trasportarli nei vasi linfatici. Altri microbi e antigeni solubili possono entrare nei vasi linfatici senza essere associati alle cellule dendritiche. Inoltre, nei vasi linfatici entrano anche i mediatori solubili dell'infiammazione prodotti nei siti di infezione, come le chemochine. I linfonodi sono collocati lungo i vasi linfatici e agiscono come filtri che controllano gli antigeni solubili e quelli associati alle cellule

presenti nella linfa prima che questa raggiunga il sangue. Gli antigeni catturati possono essere riconsciuti dalle cellule del sistema immunitario adattativo. Questo processo è descritto nel Capitolo 6.

Linfonodi

I linfonodi sono organi linfoidi secondari capsulati e vascolarizzati con caratteristiche anatomiche tali da facilitare l'inizio delle risposte adattative nei confronti degli antigeni che arrivano dai tessuti attraverso i vasi linfatici (Fig. 2-12). I linfonodi sono localizzati lungo canali linfatici che corrono in tutto l'organismo e hanno perciò accesso agli antigeni penetrati attraverso gli epiteli e presenti nel liquido interstiziale di molti tessuti. Nel corpo umano sono presenti circa 500 linfonodi. Il linfonodo è circondato da una capsula fibrosa al di sotto della quale si trovano i seni linfonodali tappezzati di cellule reticolari, collegate le une alle altre con un sistema di fibrille di collageno e di altre proteine della matrice extracellulare, e occupati dalla linfa, dai macrofagi, dalle cellule dendritiche e da altri tipi cellulari. I capillari afferenti arrivano nel seno sottocapsulare (o marginale) in modo che la linfa possa riversarsi direttamente nel seno midollare, per poi uscire dal linfonodo attraverso i vasi linfatici efferenti. Al di sotto della regione più interna del seno sottocapsulare si trova la regione corticale ricca di linfociti. La corticale esterna contiene aggregati di cellule chiamati **follicoli**. Alcuni follicoli contengono aree centrali, chiamate **centri germinativi**, che si colorano debolmente con i coloranti comunemente usati in istologia. Ogni centro germinativo consiste in una zona scura infiltrata da linfociti B in proliferazione chiamati centroblasti e una zona chiara che contiene cellule chiamate centrociti, che hanno smesso di proliferare e sono state selezionate per sopravvivere e differenziarsi ulteriormente. La reazione del centro germinativo durante le risposte umorali immunitarie è descritta nel Capitolo 12. I follicoli senza centri germinativi sono detti follicoli primari, quelli con i centri germinativi follicoli secondari. La corticale che circonda i follicoli prende il nome di regione corticale parafollicolare o paracorticale ed è organizzata in cordoni, ovvero regioni con una micro-anatomia complessa costituita da proteine della matrice, fibre reticolari, linfociti, cellule dendritiche e fagociti mononucleati.

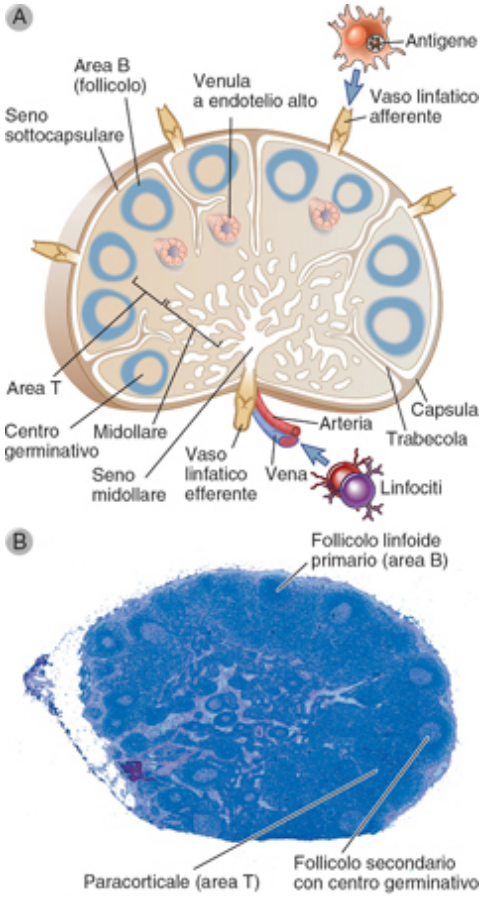


FIGURA 2-12 Morfologia del linfonodo. A. Raffigurazione schematica di un linfonodo che mostra le aree T e B e le vie di accesso dei linfociti e degli antigeni (nella figura sono stati catturati dalle cellule dendritiche). **B.** Fotografia ottenuta al microscopio ottico di un linfonodo che mette in evidenza le aree T e B. (*Per gentile concessione del Dr. James Gulizia, Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts*.)

Organizzazione anatomica dei linfociti B e T

I linfociti B e T sono segregati in zone distinte della regione corticale dei linfonodi, ognuna delle quali è organizzata con una architettura specifica definita dalle fibre reticolari e dalle cellule stromali (Fig. 2-13). I follicoli rappresentano le regioni del linfonodo nelle quali sono presenti i linfociti B. Sono localizzati nella corticale e organizzati intorno alle FDC, le quali hanno protrusioni che si intrecciano a formare un denso sistema reticolare. I follicoli primari contengono per lo più linfociti B maturi e naïve. I centri germinativi si sviluppano in risposta al riconoscimento degli antigeni e sono sede di una notevole proliferazione dei linfociti B, della selezione dei cloni che producono anticorpi ad alta affinità e delle plasmacellule a lunga

sopravvivenza. I linfociti T si localizzano principalmente nella regione corticale, sottostante e tra i follicoli. Queste aree ricche di linfociti T, spesso chiamate paracorteccia, contengono una rete di **fibroblasti reticolari** (*Fibroblastic Reticular Cells*, FRC) molti dei quali organizzati in trabecole definite condotti FRC (Fig. 2-14). Questi condotti hanno un diametro di 0,2-3 μm e contengono strutture costituite da molecole della matrice extracellulare, tra cui fasci paralleli di fibre di collageno immerse in una struttura a rete di microfibrille di fibrillina, tutte strettamente avvolte da una membrana basale prodotta da un manicotto di FRC. I condotti iniziano nel seno sottocapsulare e arrivano fino ai vasi linfatici del seno midollare e ai vasi sanguigni della corticale, chiamati **venule a endotelio alto** (*High Endothelial Venules*, HEV). I linfociti T naïve entrano nelle aree T attraverso le HEV, come descritto in dettaglio nel Capitolo 3, e si localizzano nella regione corticale attorno a questi condotti. La maggior parte (70% circa) dei linfociti della corticale è costituita da linfociti T helper $CD4^+$, inframmezzati a un numero relativamente limitato di cellule $CD8^+$. Queste proporzioni possono notevolmente cambiare nel corso di un'infezione. Per esempio, durante un'infezione virale vi è generalmente un forte aumento dei linfociti T $CD8^+$. La regione paracorticale dei linfonodi contiene anche cellule dendritiche in buona parte associate ai condotti FRC.

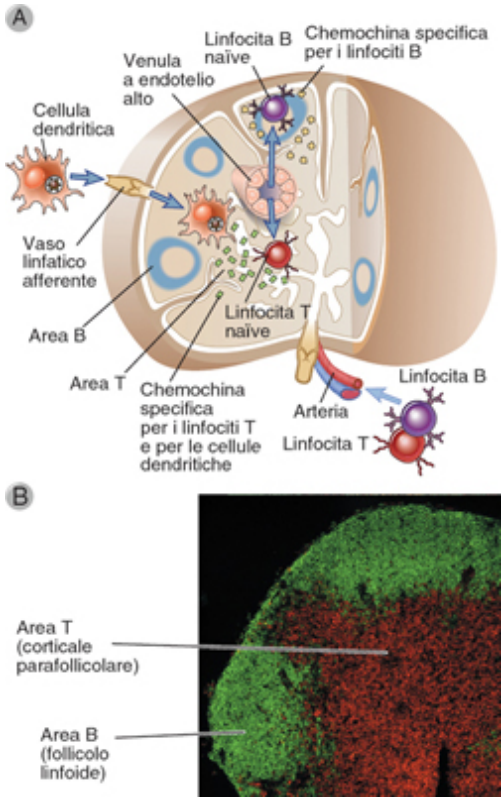


FIGURA 2-13 Segregazione dei linfociti B e T in un linfonodo. A. La figura evidenzia in modo schematico il processo di migrazione dei linfociti T e B naïve nelle diverse aree linfonodali. I linfociti naïve penetrano nel linfonodo attraverso un'arteria, escono dal circolo muovendosi attraverso la parete della venula a endotelio alto e successivamente i linfociti B e T migrano verso zone differenti del linfonodo attirati selettivamente dalle chemochine che sono prodotte in queste aree. È anche mostrata la migrazione delle cellule dendritiche, che catturano gli antigeni nei siti di ingresso e raggiungono le aree T del linfonodo attraverso i vasi linfatici afferenti. **B.** Questa fotografia rappresenta una sezione di un linfonodo in cui i linfociti B, localizzati nei follicoli, sono colorati in *verde* e i linfociti T, localizzati nella regione corticale parafollicolare, sono colorati in *rosso*. Le colorazioni sono state effettuate con la tecnica dell'immunofluorescenza (vedi Appendice IV per i dettagli). (*Per gentile concessione delle Dr.sse Kathryn Pape e Jennifer Walter, University of Minnesota School of Medicine, Minneapolis*.) Anche la milza mostra una simile segregazione anatomica delle cellule T e B (vedi Fig. 2-15).

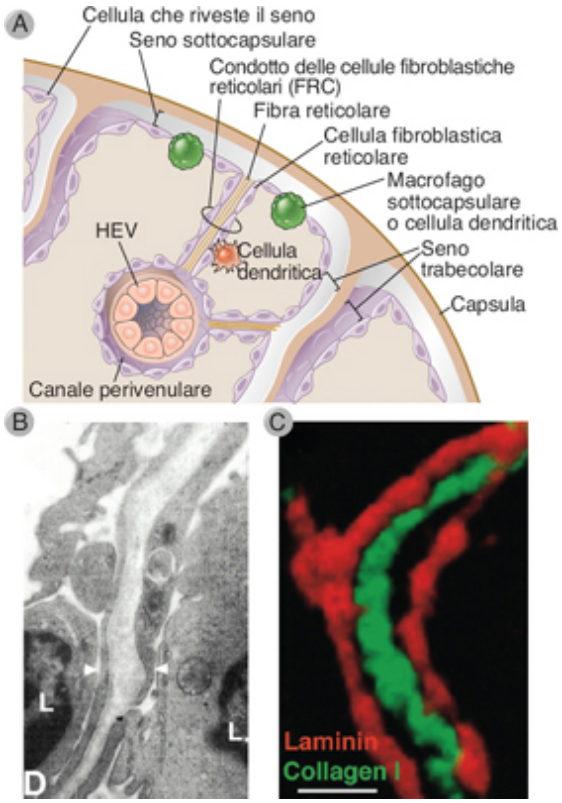


FIGURA 2-14 Microanatomia della regione corticale del linfonodo. A. Raffigurazione schematica di un linfonodo che mostra la via di drenaggio della linfa dal seno sottocapsulare attraverso i condotti costituiti dalle cellule fibroreticolari fino al canale perivenulare che circonda le venule a endotelio alto (*High Endothelial Venule*, HEV). **B.** Fotografia ottenuta al microscopio elettronico a trasmissione di un condotto FRC circondato da fibroblasti reticolari (*teste delle freccie*) e linfociti adiacenti (L). (*Da Gretz JE, CC Norbury, AD Anderson, AO Proudfoot AEI e Shaw S: "Le chemochine della milza e altre molecole a basso peso molecolare arrivano alle venule ad alto endotelio attraverso condotti specializzati e una barriera funzionale nella corticale del linfonodo delimita l'accesso al microambiente dove si trovano i linfociti". The Journal of Experimental Medicine 192:1425-1439, 2000.*) **C.** Colorazione in immunofluorescenza di un condotto FRC formato da laminina (*in rosso*) e da fibrille di collageno (*in verde*), proteine della membrana basale. (*Da Sixt M, Sixt M, Nobuo K, Selg M, Samson T, Roos G, Reinhardt DP, Pabst R, Lutz M, Sorokin L: "Il sistema dei condotti trasporta gli antigeni solubili dalla linfa afferente alle cellule dendritiche residenti nelle aree T dei linfonodi". Immunity 22:19-29, 2006. Copyright © 2005 by Elsevier Inc.*)

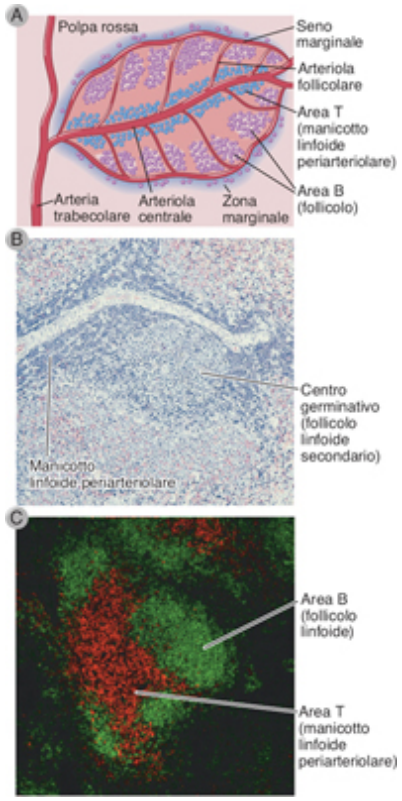


FIGURA 2-15 Morfologia della milza. A. Rappresentazione schematica della milza in cui è evidenziata la polpa bianca, costituita dalle aree T e B. **B.** Microfotografia di una sezione di milza umana che mostra un'arteria trabecolare circondata dal manicotto linfoide periarteriolare e da un follicolo munito di centro germinativo. Nell'area circostante si trova la polpa rossa, ricca in sinusoidi vascolari. **C.** Identificazione mediante immunoistochimica delle aree T e B in una sezione trasversale della milza intorno a un'arteriola. I linfociti T presenti nel manicotto linfoide periarteriolare sono colorati in *rosso*, le cellule B follicolari in *verde*. (*Per gentile concessione delle Dr.sse Kathryn Pape e Jennifer Walter, University of Minnesota School of Medicine, Minneapolis, Minnesota*.)

La segregazione anatomica dei linfociti B e T in aree distinte del linfonodo dipende dalla produzione compartimentalizzata di citochine da parte delle cellule stromali, che indirizzano la migrazione dei linfociti (vedi Fig. 2-13). I linfociti B e T naïve circolanti entrano nel linfonodo attraverso un'arteria da dove penetrano nello stroma passando attraverso le HEV, che sono localizzate al centro dei cordoni della corticale. Le citochine che determinano la localizzazione dei linfociti nei linfonodi sono chiamate **chemochine** (citochine chemoattrattanti) e si legano a recettori per le chemochine presenti sui linfociti. Le chemochine costituiscono una famiglia numerosa di proteine di 8-10 kDa coinvolte in molteplici funzioni cellulari, quali lo sviluppo e il mantenimento dell'architettura dei tessuti e le risposte immunitarie e infiammatorie. Discuteremo le caratteristiche delle

chemochine e dei loro recettori nel Capitolo 3. I linfociti T naïve esprimono un recettore chiamato CCR7, che lega le chemochine CCL19 e CCL21 prodotte dalle cellule stromali nelle aree T del linfonodo. Queste chemochine favoriscono la migrazione dei linfociti T naïve richiamandoli dal sangue attraverso la parete delle HEV nelle aree T. Anche le cellule dendritiche che sono attivate dai microbi e penetrano nel linfonodo attraverso i vasi linfatici esprimono CCR7 e questo spiega perché queste cellule si localizzano nella stessa area dove migrano i linfociti T naïve (vedi Cap. 6). I linfociti B naive esprimono bassi livelli di CCR7 e livelli più elevati di un altro recettore per le chemochine, CXCR5, che riconosce la chemochina CXCL13, prodotta dalle FDC follicolari. Pertanto, anche i linfociti B naïve presenti nel circolo penetrano nei linfonodi attraverso le HEV e successivamente migrano all'interno dei follicoli. Un'altra citochina, la linfotossina (che non è una chemochina), stimola la produzione di CXCL13 nei follicoli. Il ruolo svolto dalle chemochine e dalle altre citochine nel regolare la localizzazione dei linfociti e nella formazione degli organi linfoidi è stato definito mediante studi condotti in modelli sperimentali *in vivo*. Per esempio, i topi knockout per CXCR5 mancano dei follicoli nei linfonodi e nella milza, mentre i topi knockout per CCR7 non possiedono aree T.

Lo sviluppo dei linfonodi, così come degli altri organi linfoidi secondari, dipende da cellule che inducono il tessuto linfoide e dall'azione coordinata di numerose citochine, chemochine e fattori di trascrizione. Durante la vita fetale, queste cellule, che sono una sottoclasse delle cellule linfoidi innate discusse in precedenza, stimolano lo sviluppo dei linfonodi e degli altri organi linfoidi secondari. Questa funzione è dovuta alla secrezione di diverse proteine, tra cui le più studiate sono la linfotossina-α (LTα) e la linfotossina-β (LTβ). I topi che mancano dell'una o dell'altra citochina non sviluppano i linfonodi e gli altri tessuti linfoidi secondari associati all'intestino e mostrano nella milza una polpa bianca disorganizzata. La LTβ prodotta dalle cellule induttrici del tessuto linfoide stimola le cellule stromali presenti nelle diverse aree di un organo linfoide secondario in via di sviluppo a secernere chemochine, che aiutano a organizzare la sua struttura. Le FDC sono attivate dalla LTβ a produrre la chemochina CXCL13, che ha la funzione di reclutare i linfociti B e organizzare il follicolo in via di sviluppo. Le cellule fibroblastiche reticolari (FRC, descritte in precedenza), si attivano

producendo CCL19 e CCL21, che reclutano i linfociti T e le cellule dendritiche, formando le aree dei linociti T.

La segregazione anatomica dei linfociti T e B assicura che ogni popolazione linfocitaria sia in stretto contatto con appropriate cellule accessorie, cioè i linfociti B con le FDC e i linfociti T con le cellule dendritiche. Inoltre, in virtù di questa accurata segregazione, le popolazioni dei linfociti B e T sono mantenute separate fino al momento in cui non sia necessaria la loro interazione funzionale. Come descritto nei Capitoli 9 e 12, in seguito alla stimolazione da parte dell'antigene, i linfociti B e T modificano l'espressione dei recettori delle chemochine e iniziano a migrare le une verso le altre in risposta alle chemochine e altri mediatori.

I linfociti T attivati migrano verso i follicoli per aiutare i linfociti B, oppure fuoriescono dal linfonodo per entrare in circolo, mentre i linfociti B attivati migrano nei centri germinativi e, dopo la differenziazione in plasmacellule, escono per andare a risiedere nel midollo.

Trasporto dell'antigene attraverso i linfonodi

Le sostanze presenti nella linfa entrano nel seno sottocapsulare del linfonodo, qui sono selezionate in base al peso molecolare e indirizzate ai differenti tipi cellulari per attivare le diverse risposte immunitarie. La struttura del seno sottocapsulare permette alle cellule di prendere contatto o di migrare nella regione corticale sottostante, ma non consente il libero passaggio delle molecole solubili. Microbi e antigeni ad alto peso molecolare vengono catturati dai macrofagi del seno e presentati ai linfociti B presenti nella corticale proprio al di sotto del seno. Questo costituisce il primo momento della risposta anticorpale verso questi antigeni. Gli antigeni solubili a basso peso molecolare escono dal seno attraverso i condotti FRC e arrivano alle cellule dendritiche della corticale localizzate lungo i condotti. Le cellule dendritiche residenti hanno protrusioni che si insinuano tra le cellule che ricoprono i condotti e sono in grado di catturare per pinocitosi gli antigeni solubili. Molte delle risposte T nei confronti di antigeni di origine microbica possono essere attivate in questo modo; tuttavia, come si vedrà nel Capitolo 6, per ottenere risposte più ampie e consistenti è necessario che l'antigene arrivi al linfonodo attraverso le cellule dendritiche tissutali. Nella linfa che passa attraverso i condotti, oltre agli antigeni, vengono trasportati

anche i mediatori solubili dell'infiammazione, come le citochine e le chemochine. Alcuni di questi possono agire sulle cellule dendritiche adiacenti, mentre altri raggiungono le HEV, dove confluiscono nei condotti. Questo meccanismo fa sì che la reazione infiammatoria, presente nei tessuti periferici, venga percepita a livello linfonodale e influenzi il reclutamento e l'attivazione dei linfociti.

Milza

La milza è un organo molto vascolarizzato la cui funzione principale è rimuovere dal circolo i globuli rossi senescenti o danneggiati e le particelle come gli immunocomplessi e i microbi opsonizzati, oltre che dare inizio alle risposte adattative contro gli antigeni presenti nel sangue. La milza pesa circa 150 g nell'adulto ed è localizzata nel quadrante superiore sinistro dell'addome. Il parenchima della milza è anatomicamente e funzionalmente suddiviso in polpa rossa, composta prevalentemente da sinusoidi vascolari ripieni di sangue, e in polpa bianca, ricca in linfociti. Il sangue entra nella milza da una singola arteria splenica, la quale penetra attraverso la capsula in corrispondenza dell'ilo e si divide in rami di calibro sempre minore circondati da trabecole fibrose protettive e di supporto (Fig. 2-15). Alcuni rami delle arteriole dell'arteria splenica terminano in estesi sinusoidi vascolari, pieni di globuli rossi, con macrofagi e altre cellule posizionate lungo le pareti. I sinusoidi terminano a loro volta in venule che confluiscono nella vena splenica, che porta il sangue dalla milza alla circolazione portale. I macrofagi della polpa rossa funzionano da importante filtro del sangue, rimuovendo i microbi, le cellule danneggiate e le cellule o i microbi opsonizzati dagli anticorpi. Gli individui splenectomizzati sono suscettibili alle infezioni disseminate da parte di batteri capsulati come gli pneumococchi e i meningococchi, probabilmente perché tali microrganismi vengono normalmente eliminati mediante opsonizzazione e fagocitosi a livello splenico.

La polpa bianca contiene le cellule responsabili delle risposte nei confronti degli antigeni presenti nel sangue. Nella polpa bianca sono presenti numerosi raggruppamenti di linfociti densamente ammassati, che appaiono come noduli bianchi in mezzo alla polpa rossa. La polpa bianca è organizzata attorno alle arterie centrali, che sono diramazioni dell'arteria

splenica, diverse da quelle che formano i sinusoidi vascolari. Diramazioni di dimensioni minori di ogni arteria centrale passano attraverso l'area ricca di linfociti e sboccano nel seno marginale. Una regione di cellule specializzate che circondano il seno marginale, detta **zona marginale**, fa da confine tra la polpa rossa e quella bianca. L'architettura della polpa bianca è simile a quella dei linfonodi, con zone distinte per i linfociti T e B. Nel topo le arterie centrali sono circondate da manicotti di linfociti, costituiti prevalentemente da linfociti T. Per la loro localizzazione anatomica, i morfologi hanno chiamato queste aree **manicotti linfoidi periarteriolari**. I follicoli ricchi di linfociti B occupano lo spazio tra il seno marginale e il manicotto periarteriolare. Come nei linfonodi, le aree T nella milza contengono una rete complessa di condotti, costituiti da proteine della matrice ricoperte da cellule simili alle FRC. La zona marginale, che si trova subito all'esterno del seno marginale è una regione ben distinta dove si trovano linfociti B e macrofagi specializzati. I linfociti B di questa regione, chiamate linfociti B della zona marginale, sono funzionalmente diversi dai linfociti B follicolari e hanno un repertorio limitato di specificità per l'antigene. Nell'uomo, l'architettura della polpa bianca è più complessa rispetto a quella del topo, con numerose zone marginali interne ed esterne e una zona perifollicolare. Gli antigeni presenti nel sangue sono portati nel seno marginale dalle cellule dendritiche circolanti o sono catturati dai macrofagi della zona marginale.

La localizzazione anatomica delle APC, dei linfociti B e dei linfociti T della polpa bianca favorisce le interazioni necessarie per l'attivazione delle risposte umorali, come sarà discusso nel Capitolo 12. La segregazione dei linfociti T nei manicotti linfoidi periarteriolari e dei linfociti B nei follicoli e nelle zone marginali è un processo regolato in modo preciso dalla produzione di diverse citochine e chemochine da parte delle cellule stromali di queste aree, in modo analogo a quanto succede nei linfonodi. La chemochina CXCL13 e il suo recettore CXCR5 sono necessari per la migrazione dei linfociti B nei follicoli, mentre CCL19 e CCL21 e il loro recettore CCR7 sono necessari per la migrazione dei linfociti T naïve nei manicotti periarteriolari. La linfotossina stimola la produzione di queste chemochine da parte delle cellule stromali non linfoidi.

Strutture linfoidi dei distretti periferici

Tutte le principali barriere epiteliali dell'organismo, comprese la cute, la mucosa gastroenterica e la mucosa bronchiale, hanno un sistema di linfonodi, strutture linfoidi non capsulate e sistemi cellulari propri che lavorano in modo coordinato per produrre risposte specializzate contro i patogeni che hanno superato la barriera. Il sistema immunitario associato alla cute si è evoluto per fronteggiare la grande varietà di microbi presenti nell'ambiente. I componenti del sistema immunitario associato alle mucose gastrointestinale e bronchiale costituiscono il tessuto linfoide associato alle mucose (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*, MALT) e partecipano alle risposte contro gli antigeni ingeriti e inalati e contro i microbi. La cute e il MALT contengono numerose cellule dell'immunità innata e adattativa. Nel Capitolo 14 parleremo delle caratteristiche di questi sistemi regionali.

RIEPILOGO

* L'organizzazione anatomica delle cellule e dei tessuti del sistema immunitario è di fondamentale importanza per la generazione di risposte innate e adattative efficaci. Questa organizzazione permette l'arrivo rapido di cellule dell'immunità innata, inclusi i neutrofili e i monociti, nei siti di infezione e permette a un piccolo numero di linfociti specifici per un antigene di localizzarsi e rispondere con efficacia nei confronti di questo antigene, indipendentemente dal sito di ingresso dell'antigene stesso.
* Le cellule che svolgono la maggior parte delle funzioni effettrici sono i fagociti (neutrofili e macrofagi), le APC (macrofagi e cellule dendritiche) e i linfociti.
* I neutrofili sono il tipo di leucociti presenti nel sangue numericamente più consistente, hanno nuclei tipicamente multilobati e segmentati e abbondante citoplasma ricco di granuli. Vengono reclutati rapidamente nei siti di infezione e di danno tissutale, dove svolgono funzioni di fagocitosi.
* I monociti sono i precursori circolanti dei macrofagi tissutali. Tutti i tessuti hanno macrofagi residenti, quali cellule fagociti che, essi ingeriscono e uccidono i microbi e le cellule morte dell'ospite, secernono citochine e chemochine che favoriscono il reclutamento dei leucociti dal sangue e iniziano la riparazione dei tessuti danneggiati.
* Le APC, quali le cellule dendritiche, i fagociti mononucleati e le FDC, hanno il compito di presentare gli antigeni e di promuovere l'attivazione dei linfociti.
* I linfociti B e T esprimono recettori per l'antigene altamente diversificati e sono le cellule responsabili della specificità e della memoria immunologica. Molte molecole di membrana sono espresse in modo distinto dalle diverse sottopopolazioni di linfociti e di leucociti; queste molecole vengono identificate sulla base della nomenclatura CD.
* Le cellule linfoidi innate sono cellule effettrici del sistema immunitario innato, alcune delle quali svolgono funzioni simili alle cellule T effettrici $CD4^+$ o $CD8^+$. Queste cellule, che includono le cellule NK, non esprimono recettori per l'antigene estremamente diversificati e distribuiti in modo clonale.
* Sia i linfociti B sia i linfociti T derivano da un precursore comune presente nel midollo osseo. La maturazione dei linfociti B avviene nel midollo osseo, mentre i precursori dei

linfociti T migrano e maturano nel timo. In seguito alla maturazione, i linfociti B e T lasciano il midollo e il timo, entrano in circolo e si insediano negli organi linfoidi secondari.

* I linfociti B e T naïve (vergini) sono cellule mature che non sono ancora state stimolate dall'antigene. In seguito all'incontro con l'antigene, esse vanno incontro a proliferazione, si differenziano in linfociti effettori e rappresentano le cellule responsabili delle risposte immunitarie protettive. I linfociti B effettori sono plasmacellule che secernono anticorpi. I linfociti T effettori comprendono i linfociti T helper $CD4^+$ che secernono citochine e i linfociti T citotossici $CD8^+$.
* Alcuni dei linfociti attivati dall'antigene si differenziano in cellule della memoria, in grado di sopravvivere per un lungo periodo in stato di quiescenza. Queste cellule sono responsabili delle risposte rapide e amplificate che si osservano in seguito alla successiva riesposizione a un determinato antigene.
* Gli organi del sistema immunitario possono essere suddivisi in organi linfoidi generativi, o primari (midollo osseo e timo), dove i linfociti maturano, e in organi periferici o secondari (linfonodi, milza e il sistema immunitario mucoso e cutaneo), dove i linfociti naïve vengono attivati dagli antigeni.
* Il midollo osseo contiene le cellule staminali in grado di differenziarsi in tutte le cellule del sangue, compresi i linfociti, ed è la sede in cui avviene la maturazione di tutti questi tipi cellulari, con l'eccezione dei linfociti T, che maturano nel timo.
* Il fluido extracellulare è continuamente drenato dai tessuti ai linfonodi e poi al sangue, attraverso i vasi linfatici. Attraverso la linfa gli antigeni microbici sono portati ai linfonodi in forma solubile e all'interno delle cellule dendritiche, e qui sono riconosciuti dai linfociti.
* I linfonodi sono organi linfoidi secondari capsulati localizzati in tutto il corpo lungo i vasi linfatici, dove i linfociti B e T naïve rispondono agli antigeni presenti nella linfa. La milza è un organo capsulato che si trova nella cavità addominale, dove le cellule del sangue senescenti oppure opsonizzate vengono rimosse, e in cui i linfociti rispondono agli antigeni presenti nel sangue. Sia i linfonodi sia la polpa bianca della milza sono organizzati in aree B (i follicoli) e T. Le aree T rappresentano anche la sede dove si localizzano le cellule dendritiche mature, APC specializzate nell'attivare i linfociti T naïve. Le FDC si localizzano nelle aree B e svolgono la funzione di attivare i linfociti B durante le risposte umorali nei confronti di antigeni proteici. Lo sviluppo dei tessuti linfoidi secondari dipende dalla presenza di citochine e di cellule specifiche presenti nel tessuto linfoide.

LETTURE CONSIGLIATE

Cellule del sistema immunitario

Chow A.; Brown B.D.; Merad M: Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nature Reviews Immunology* 11:788–798 (2011).

Davies L.C.; Jenkins S.J.; Allen J.E.; Taylor P.R: Tissue-resident macrophages. *Nature Immunology* 14:986–995 (2013).

Farber D.L.; Yudanin N.A.; Restifo N.P: Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nature Reviews Immunology* 14:24–35 (2014).

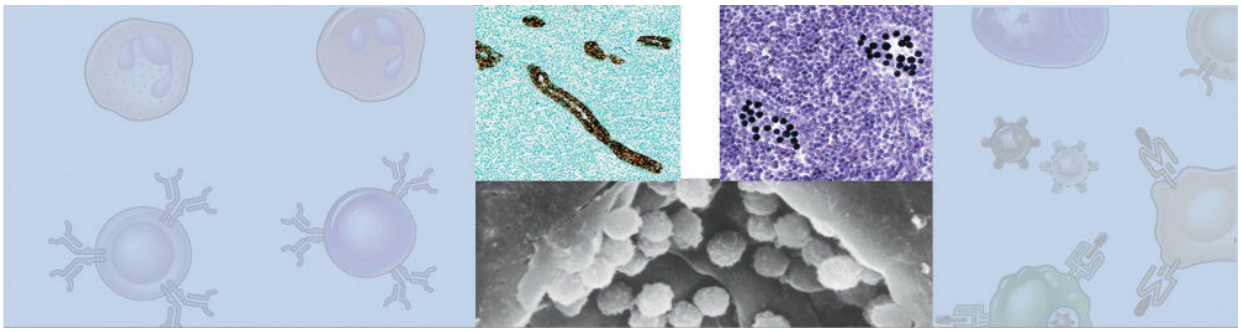
Geissmann F.; Manz M.G.; Jung S.; Sieweke M.H.; Merad M.; Ley K: Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327:656–661 (2010).
Surh C.D.; Sprent J: Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* 29:848–862 (2008).
Wynn T.A.; Chawla A.; Pollard J.W: Macrophage biology in development, homeostasis, and disease. *Nature* 496:445–455 (2013).

Tessuti del sistema immunitario

Bronte V.; Pittet M.J: The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity* 39:806–818 (2013).
Lane P.; Kim M.-Y.; Withers D.; Gaspal F.; Bekiaris V.; Desanti G.; Khan M.; McConnell F.; Anderson G: Lymphoid tissue inducer cells in adaptive CD4 T cell dependent responses. *Seminars in Immunology* 20:159–163 (2008).
Mueller S.N.; Germain R.N: Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nature Reviews Immunology* 9:618–629 (2009).
Ruddle N.H.; Akirav E.M: Secondary lymphoid organs: responding to genetic and environmental cues in ontogeny and the immune response. *Journal of Immunology* 183:2205–2212 (2009).

CAPITOLO

3



Reclutamento dei leucociti nei tessuti

MIGRAZIONE DEI LEUCOCITI: CARATTERISTICHE GENERALI

MOLECOLE DI ADESIONE ESPRESSE DAI LEUCOCITI E DALLE CELLULE ENDOTELIALI COINVOLTE NEL RECLUTAMENTO LEUCOCITARIO

- Selectine e ligandi per le selectine
- Integrine e ligandi per le integrine

CHEMOCHINE E RECETTORI PER LE CHEMOCHINE

- Chemochine: struttura, regolazione e recettori
- Attività biologiche delle chemochine

INTERAZIONI LEUCOCITI-CELLULE ENDOTELIALI E RECLUTAMENTO DEI LEUCOCITI NEI TESSUTI

MIGRAZIONE DI NEUTROFILI E MONOCITI VERSO SITI DI INFEZIONE O DI DANNO TISSUTALE

MIGRAZIONE E RICIRCOLAZIONE DEI LINFOCITI T

- Ricircolazione dei linfociti T naïve tra il sangue e gli organi linfoidi secondari
- Ricircolazione dei linfociti T attraverso altri organi linfoidi
- Migrazione dei linfociti T effettori verso i siti di infiammazione
- Migrazione dei linfociti T della memoria

HOMING DEI LINFOCITI B

RIEPILOGO

Una caratteristica peculiare che contraddistingue il sistema immunitario differenziandolo da tutti gli altri tessuti del nostro corpo è il movimento costante e strettamente regolamentato delle sue componenti cellulari, che passano dal sangue ai tessuti e spesso ritornano in circolo. Questo movimento assolve a tre principali funzioni (Fig. 3-1):

- Indirizzamento dei leucociti della linea differenziativa mieloide (principalmente neutrofili e monociti) dal circolo ematico ai focolai tissutali di infezione e danno, per svolgere la loro funzione protettiva eliminando i patogeni, rimuovendo i detriti cellulari e riparando i danni tissutali.
- Indirizzamento dei linfociti dai loro siti di maturazione (midollo e timo) agli organi linfoidi secondari, per riconoscere gli antigeni e differenziarsi in linfociti effettori.

- Indirizzamento dei linfociti effettori dagli organi linfoidi secondari, in cui si erano attivati, ai siti di infezione presenti nei tessuti periferici per svolgere la loro funzione protettiva.

La migrazione di un leucocita dal sangue verso un determinato tessuto, o verso un sito di infezione o di danno tissutale, viene spesso definita **homing** leucocitario, mentre il movimento dei leucociti dal sangue ai tessuti prende il nome di **migrazione** o **reclutamento**. La capacità dei linfociti di migrare ripetutamente in organi linfoidi secondari, risiedervi in via transitoria e tornare nel sangue si chiama **ricircolazione**. Il reclutamento dei leucociti e delle proteine plasmatiche dal sangue al sito di infezione riveste un ruolo essenziale nell'ambito del processo **infiammatorio**. L'infiammazione è innescata dal riconoscimento di microbi e cellule morte che avviene nel corso delle risposte innate e viene perfezionata e potenziata durante la risposta adattativa. La risposta infiammatoria porta le cellule e le molecole deputate alla difesa nei siti dove sono presenti gli agenti dannosi da fronteggiare. Ritorneremo a parlare dell'infiammazione nel Capitolo 4, nel contesto dell'immunità innata e nel Capitolo 19 nella trattazione delle patologie su base infiammatoria.

MIGRAZIONE DEI LEUCOCITI: CARATTERISTICHE GENERALI

Il processo di homing e reclutamento tissutale dei leucociti è regolamentato da alcuni principi comuni.

- I linfociti naïve migrano di continuo principalmente in tessuti linfoidi secondari, e non in altri tessuti, indipendentemente dalla presenza o meno di infezione o lesione, mentre i linfociti precedentemente attivati dall'antigene (per esempio i linfociti effettori) e le cellule mieloidi migrano nei tessuti sede di processi infettivi o di danno.
- Il processo di homing e reclutamento richiede la temporanea adesione dei leucociti all'endotelio vascolare. Questo processo coinvolge molecole di membrana espresse sia dai leucociti (recettori di homing e

recettori per le chemochine) sia dalle cellule endoteliali (addressine e chemochine).

- Le cellule endoteliali presenti nei siti di infezione e di danno tissutale sono attivate dalle citochine secrete dai macrofagi e da altre cellule presenti in questi siti, con un conseguente aumento dell'espressione delle molecole di adesione e delle chemochine. Questo determina un aumento dell'adesività delle cellule endoteliali per le cellule mieloidi circolanti e per i linfociti effettori.

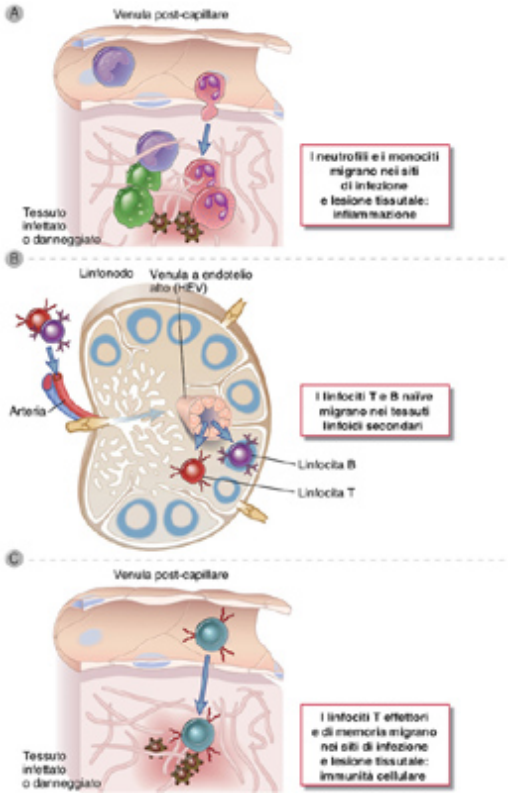


FIGURA 3-1 Scopo del reclutamento leucocitario dal sangue ai tessuti. A. I neutrofili e i monociti hanno origine nel midollo osseo, circolano nel sangue e sono reclutati nei tessuti sede di focolai infettivi con lo scopo di eradicare l'infezione e svolgere la funzione di riparo tissutale. **B.** I linfociti naïve originano nel midollo osseo o nel timo e si distribuiscono negli organi linfoidi secondari, quali i linfonodi o la milza (non mostrata in figura), dove si attivano in seguito al riconoscimento degli antigeni e si differenziano in linfociti effettori. **C.** I linfociti effettori che si sviluppano negli organi linfoidi secondari migrano nei tessuti sede di focolaio infettivo, dove partecipano alle difese antimicrobiche.

Poiché l'espressione delle molecole d'adesione leucociti-cellule endoteliali dipende principalmente dall'attivazione delle cellule coinvolte, i leucociti migrano attraverso l'endotelio solo quando è necessario, in seguito al

riconoscimento di microbi e tessuti necrotici che costituiscono gli stimoli più comuni per l'attivazione di questo processo.

Il reclutamento dei leucociti dal sangue ai tessuti richiede l'adesione delle cellule circolanti alla superficie luminale delle cellule endoteliali che rivestono le venule postcapillari e la loro successiva migrazione attraverso la barriera endoteliale e la parete vascolare per raggiungere il tessuto extravascolare. Questo processo è simile per i diversi tipi di leucociti (neutrofili, monociti e linfociti naïve ed effettori) che si dirigono nei tessuti (organi linfoidi secondari e tessuti infettati), nonostante le molecole coinvolte, chemochine e molecole di adesione, possano variare per assicurare una migrazione specifica. Prima di iniziare a descrivere questo processo ci soffermeremo sulle proprietà e sulle funzioni delle molecole di adesione e delle chemochine che sono coinvolte nel reclutamento cellulare.

MOLECOLE DI ADESIONE ESPRESSE DAI LEUCOCITI E DALLE CELLULE ENDOTELIALI COINVOLTE NEL RECLUTAMENTO LEUCOCITARIO

L'adesione dei leucociti circolanti all'endotelio vascolare è mediata da due classi di molecole, chiamate **selectine** e **integrine**, e dai loro ligandi. L'espressione di queste molecole varia tra le diverse popolazioni leucocitarie e nei vasi sanguigni presenti nei diversi distretti anatomici, condizionando il tipo di cellule e i tessuti nei quali migra ogni singolo tipo cellulare.

Selectine e ligandi per le selectine

Le selectine sono molecole di adesione localizzate sulla membrana plasmatica in grado di legare i carboidrati. Sono responsabili delle interazioni a bassa affinità che caratterizzano le fasi iniziali dell'adesione dei leucociti circolanti alle cellule endoteliali che rivestono le venule postcapillari (Tab. 3-1). Il domino extracellulare delle selectine è simile a quello delle lectine di tipo C, così chiamate perché *legano* i carboidrati in

modo calcio-dipendente. Le selectine e i loro ligandi sono espressi dai leucociti e dalle cellule endoteliali.

Le cellule endoteliali esprimono due tipi di selectine, la **P-selectina** (CD62P) e la **E-selectina** (CD62E). La P-selectina, così chiamata poiché è stata caratterizzata per la prima volta nelle piastrine, è immagazzinata nei granuli citoplasmatici delle cellule endoteliali ed è rapidamente espressa sulla membrana, sul lato luminale, in risposta alle citochine, all'istamina rilasciata dai mastociti e alla trombina generata durante la cascata della coagulazione. La E-selectina è sintetizzata ed espressa sulla superficie delle cellule endoteliali nell'arco di 1-2 ore, in seguito a stimolazione da parte di citochine, quali l'interleuchina-1 (IL-1) e il fattore di necrosi tumorale (*Tumor Necrosis Factor*, TNF), che sono prodotti dai macrofagi tissutali in risposta all'infezione. Anche i prodotti microbici, come il lipopolisaccaride (LPS), stimolano l'espressione della E-selectina sulle cellule endoteliali. Parleremo dell'IL-1, del TNF e dell'LPS nell'ambito della trattazione del processo infiammatorio nel Capitolo 4.

TABELLA 3-1 Principali molecole coinvolte nell'adesione dei leucociti all'endotelio

Famiglia	Molecola	Distribuzione	Ligando (molecola; tipo di cellula)
Selectine	P-selectina	Endotelio attivato dall'istamina o dalla trombina	Sialil-Lewis X su PSGL-1 e altre glicoproteine; neutrofili, monociti, linfociti T (effettori e della memoria)
	E-selectina	Endotelio attivato dalle citochine (TNF, IL-1)	Sialil-Lewis X (per esempio CLA-1) su varie glicoproteine; neutrofili, monociti, linfociti T (effettori e della memoria)
	L-selectina	Neutrofili, monociti, linfociti T (naïve e della memoria centrale), linfociti B (naïve)	Sialil-Lewis X/PNAd su GlyCAM-1, CD34, MadCAM-1, altri; endotelio (HEV)
Integrine	LFA-1 (CD11aCD18)	Neutrofili, monociti, linfociti T (naïve, effettori e della	ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102); endotelio (indotte da citochine)

		memoria), linfociti B (naïve)	
	Mac-1 (CD11bCD18)	Neutrofili, monociti, cellule dendritiche	ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102); endotelio (indotte da citochine)
	VLA-4 (CD49aCD29)	Monociti, linfociti T (naïve, effettori, della memoria)	VCAM-1 (CD106); endotelio (indotta da citochine)
	$\alpha_4\beta_7$ (CD49dCD29)	Monociti, linfociti T (homing intestinale, naïve, effettori, della memoria), lifociti B (homing intestinale)	VCAM-1 (CD106), MadCAM-1; endotelio intestinale e tessuti linfoidi associati all'intestino

CLA-1, *Cutaneous Lymphocyte Antigen* 1; GlyCAM-1, *Glycan-bearing Cell Adhesion Molecule* 1; HEV, *High Endothelial Venule*; ICAM,-1 *IntraCellular Adhesion Molecule 1*; IL-1, *Interleukin-1*; LFA-1, *Leukocyte Function-associated Antigen* 1; MadCAM-1, *Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule 1*; PNAd, *Peripheral Node Addressin*; PSGL-1, *P-Selectin Glycoprotein Ligand 1*; TNF, *Tumor Necrosis Factor*; VCAM-1, *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*; VLA-4, *Very Late Antigen 4*.

I leucociti esprimono molecole che legano la E- e la P-selectina: si tratta di carboidrati sialilati complessi correlati alla famiglia di Lewis X e Lewis A. Queste strutture chimiche sono presenti su svariate glicoproteine espresse dai granulociti, monociti e alcuni linfociti T effettori e della memoria. Il ligando meglio caratterizzato è il tetrasaccaride sialil-Lewis X (sLeX). Il ligando della P-selectina è una glicoproteina leucocitaria di membrana, chiamata PSGL-1 (*P-SelectinGlycoprotein Ligand 1*), che deve essere modificata post-trascrizionalmente per potere esporre il carboidrato responsabile del legame con la P-selectina. Diverse molecole possono contenere i residui carboidrati riconosciuti dalla E-selectina, quali PSGL-1, il ligando-1 della E-selectina e altri glicolipidi.

Una terza selectina, la **L-selectina** (CD62L), è espressa dai leucociti e non dalle cellule endoteliali. I ligandi per la L-selectina sono sialomucine presenti sulla superficie delle cellule endoteliali, la cui espressione è aumentata dall'attivazione delle citochine. La principale struttura riconosciuta dalla L-selectina su queste sialomucine è la sialil 6-sulfo Lewis X. La L-selectina espressa dai neutrofili promuove l'adesione alle cellule endoteliali attivate dalle citochine prodotte nel sito di infiammazione (per esempio IL-1 e TNF). Nell'ambito dell'immunità adattativa la L-selectina è importante per indirizzare i linfociti B e T naïve ai linfonodi attraverso vasi

sanguigni specializzati detti **venule a endotelio alto**. I ligandi per le sialomucine espressi dalle venule a endotelio alto che legano la L-selectina dei linfociti naïve sono collettivamente definiti addressine dei linfonodi periferici (PNAd). I leucociti esprimono alla sommità dei loro microvilli la L-selectina o i carboidrati che legano la P- e la E-selectina, facilitandone l'interazione con le molecole presenti sulla superficie endoteliale.

Integrine e ligandi per le integrine

Le integrine sono proteine di membrana eterodimeriche composte da due catene polipeptidiche, legate in modo non covalente, che sono responsabili dell'adesione intercellulare o delle cellule alla matrice extracellulare, attraverso il legame specifico con i rispettivi ligandi. Esistono 30 proteine strutturalmente omologhe contenenti una delle 15 catene α e uno dei 7 tipi di catena β. La porzione extracellulare di ogni catena forma una testa globulare che contribuisce al legame tra le due catene e all'interazione con il ligando. La porzione citoplasmatica interagisce con le componenti del citoscheletro (quali vinculina, talina, actina, α-actinina e tropomiosina). Il nome *integrina* per questa famiglia deriva dall'ipotesi che tali proteine coordinino (cioè "integrino") i segnali inviati dai ligandi extracellulari con le funzioni che dipendono dal citoscheletro, quali la motilità e la polarizzazione cellulare e la fagocitosi.

Nel sistema immunitario, due sono le integrine maggiormente rilevanti espresse dai leucociti: l'antigene leucocitario associato alla funzione (*Leukocyte Function-Associated Antigen 1*, **LFA-1**; più precisamente chiamato $\alpha_L\beta_2$ o CD11aCD18) e l'antigene assai tardivo (*Very Late Antigen 4*, **VLA-4**; noto come $\alpha_4\beta_1$, o CD49dCD29) (vedi Tab. 3-1). Uno dei principali ligandi dell'integrina LFA-1 è la molecola di adesione intercellulare-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*, **ICAM-1** o CD54), una glicoproteina espressa da cellule endoteliali attivate e da altre cellule, quali linfociti, cellule dendritiche, macrofagi, fibroblasti e cheratinociti. La porzione extracellulare di ICAM-1 è composta da domini globulari detti domini immunoglobulinici (Ig), che condividono omologia di sequenza e caratteristiche strutturali con i domini presenti sulle molecole Ig. (Molte proteine del sistema immunitario contengono domini Ig e appartengono alla superfamiglia delle Ig (vedi Cap. 5). L'interazione LFA-1-ICAM-1

costituisce un evento importante nell'interazione leucocita-endotelio (trattato più avanti) e nell'interazione dei linfociti T con le cellule che presentano l'antigene (vedi Cap. 6). Due ulteriori ligandi di LFA-1, appartenenti alla superfamiglia delle Ig, sono le glicoproteine ICAM-2, espresse dalle cellule endoteliali, e ICAM-3, espresse dai linfociti. L'integrina VLA-4 lega la molecola di adesione vascolare-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*, **VCAM-1** o CD106), una proteina della superfamiglia delle Ig espressa dalle cellule endoteliali attivate. Vi sono anche altre integrine coinvolte nelle risposte innate e adattative, per esempio, Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$, CD11bCD18), espressa dai monociti circolanti, lega ICAM-1 ed è coinvolta nell'adesione all'endotelio. Mac-1 funziona anche da recettore per il complemento, lega particelle opsonizzate con prodotti che derivano dell'attivazione del complemento, quali il frammento C3b inattivato (iC3b) (trattato nei Capitoli 4 e 13), favorendo la fagocitosi dei microbi.

Un aspetto importante delle integrine consiste nella loro capacità di aumentare rapidamente l'affinità per il loro ligando in risposta a segnali intracellulari (Fig. 3-2). Questo processo prende il nome di attivazione dell'integrina e ha luogo in tutti i leucociti in risposta al legame delle chemochine con i loro recettori e nei linfociti T in seguito all'ingaggio del recettore per l'antigene. L'attivazione dei recettori per le chemochine e per l'antigene scatena segnali biochimici che coinvolgono le proteine che legano il GTP (descritti in maggior dettaglio nel Capitolo 7) che determinano l'associazione delle code citoplasmatiche delle integrine alle proteine della famiglia RAP e a proteine in grado di interagire con il citoscheletro, con un conseguente cambio conformazionale dei domini extracellulari. Nello stato di bassa affinità, i domini extracellulari di ogni subunità integrinica sono ripiegati e presentano le teste globulari che interagiscono con il ligando, vicino alla membrana. In risposta alle alterazioni della coda citoplasmatica, gli steli si estendono allontanando le teste globulari dalla membrana e posizionandole in una conformazione ottimale per l'interazione con i ligandi (vedi Fig. 3-2). Il processo attraverso il quale i segnali intracellulari, generati in risposta alle chemochine o all'antigene, cambiano la capacità di legame del dominio extracellulare delle integrine è detto "inside-out signaling".

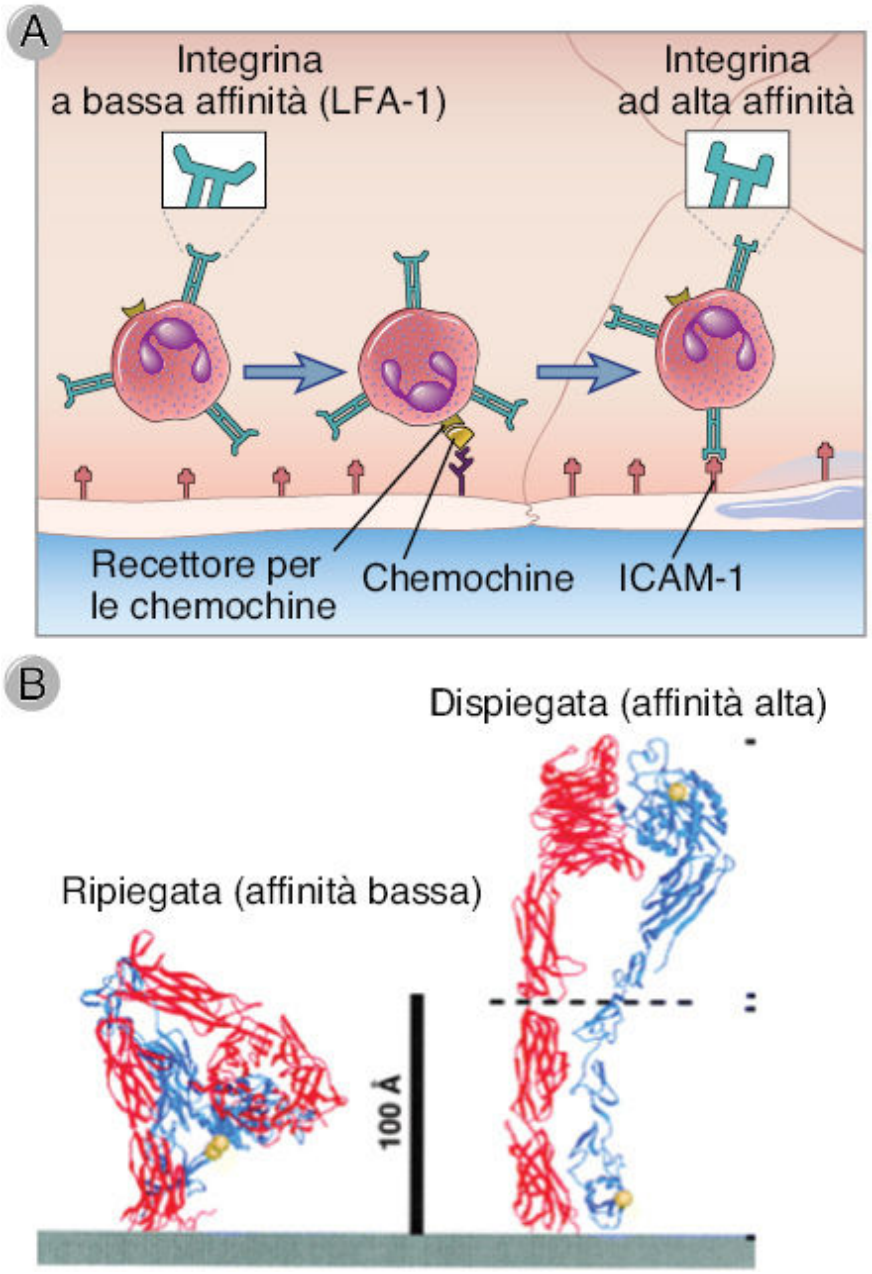


FIGURA 3-2 Attivazione delle integrine. A. Le integrine sono espresse sui leucociti circolanti in uno stato di bassa affinità. Quando un leucocita entra in contatto con le cellule endoteliali, come durante il rolling leucocitario mediato dalle selectine, le chemochine presenti sulla superficie dell'endotelio vengono riconosciute dai leucociti tramite recettori specifici. L'attivazione dei recettori delle chemochine determina l'attivazione delle integrine, che comporta l'aumento della loro affinità per i recettori espressi dalla cellule endoteliali. **B.** Rappresentazione schematica di un'integrina nella configurazione "ripiegata" a bassa affinità e nella conformazione "dispiegata" ad alta affinità. (***B,*** *Da Takagi J, Springer TA: Integrin activation and structural rearrangement, Immunological Reviews 186:141–163, 2002.*)

Le chemochine inducono anche l'aggregazione delle integrine sulla membrana e questo determina un incremento della loro concentrazione locale, con un conseguente aumento dell'avidità di legame per i ligandi espressi sulle cellule endoteliali e quindi un aumento nella forza di legame dei leucociti all'endotelio.

CHEMOCHINE E RECETTORI PER LE CHEMOCHINE

Le chemochine costituiscono una grande famiglia di citochine strutturalmente omologhe, in grado di stimolare il movimento dei leucociti direzionandone la migrazione dal circolo ai tessuti. Il nome "chemochine" deriva dall'unione delle radici delle parole "chemotassi" e "citochine". Abbiamo fatto riferimento al ruolo delle chemochine nell'organizzazione dei tessuti linfoidi nel Capitolo 2, qui descriveremo le caratteristiche generali di questa famiglia e le complesse funzioni che svolgono nell'ambito dell'immunità innata e adattativa. La Tabella 3-2 riassume le caratteristiche principali di ciascuna chemochina e dei relativi recettori.

TABELLA 3-2 Chemochine e relativi recettori

Chemochina	Denominazione originale	Recettore	Principali funzioni
CC chemochine			
CCL1	I-309	CCR8	Reclutamento di monociti e migrazione di cellule endoteliali
CCL2	MCP-1	CCR2	Reclutamento di diversi tipi di leucociti
CCL3	MIP-1α	CCR1, CCR5	Reclutamento di diversi tipi di leucociti
CCL4	MIP-1β	CCR5	Reclutamento di linfociti T, cellule dendritiche, monociti e cellule NK; corecettore per HIV
CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5	Reclutamento di diversi

			tipi di leucociti
CCL7	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3	Reclutamento di diversi tipi di leucociti
CCL8	MCP-2	CCR3, CCR5	Reclutamento di diversi tipi di leucociti
CCL9	MIP-1γ	CCR1	Reclutamento di cellule dendritiche, differenziazione osteclasti
CCL11	Eotassina	CCR3	Reclutamento di eosinofili, basofili e linfociti T_H2
CCL12	MCP-5	CCR2	Reclutamento di diversi tipi di leucociti
CCL13	MCP-4	CCR2, CCR3	Reclutamento di diversi tipi di leucociti
CCL14	HHC-1	CCR1, CCR5	
CCL15	MIP-1δ	CCR1, CCR3	Reclutamento di diversi tipi di leucociti
CCL16	HHC-4	CCR1, CCR2	Reclutamento di linfociti e monociti
CCL17	TARC	CCR4	Reclutamento di linfociti T
CCL18	DC-CK1	CCR8	Homing dei linfociti e delle cellule dendritiche
CCL19	MIP-3β/ELC	CCR7	Migrazione di linfociti T e di cellule dendritiche nelle zone parafollicolari dei linfonodi
CCL20	MIP-3α	CCR6	Reclutamento di T_H17, posizionamento di cellule dendritiche nei tessuti
CCL21	SLC	CCR7	Migrazione di linfociti T e di cellule dendritiche nelle zone parafollicolari dei linfonodi
CCL22	MDC	CCR4	Reclutamento cellule NK, linfociti T

CCL23	MPIF-1	CCR1	Migrazione di monociti, neutrofili, linfociti T
CCL24	Eotassina-2	CCR3	Reclutamento di eosinofili, basofili e linfociti T_H2
CCL25	TECK	CCR9	Reclutamento linfocitario nell'intestino
CCL26	Eotassina-3	CCR3	Reclutamento di eosinofili, basofili e linfociti T_H2
CCL27	CTACK	CCR10	Reclutamento di linfociti T nella cute
CCL28	MEC	CCR10	Homing di linfociti T e B nella mucosa
CXC chemochine			
CXCL1	GROα	CXCR2	Reclutamento di neutrofili
CXCL2	GROβ	CXCR2	Reclutamento di neutrofili
CXCL3	GROγ	CXCR2	Reclutamento di neutrofili
CXCL4	PF4	CXCR3B	Aggregazione piastrinica
CXCL5	ENA-78	CXCR2	Reclutamento di neutrofili
CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2	Reclutamento di neutrofili
CXCL7	NAP-2	CXCR2	Reclutamento di neutrofili
CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2	Reclutamento di neutrofili
CXCL9	Mig	CXCR3	Reclutamento di linfociti T effettori
CXCL10	IP-10	CXCR3, CXCR3B	Reclutamento di linfociti T effettori
CXCL11	I-TAC	CXCR3, CXCR7	Reclutamento di linfociti T effettori
CXCL12	SDF-1αβ	CXCR4	Reclutamento di diversi tipi di leucociti; corecettore per HIV

CXCL13	BCA-1	CXCR5	Migrazione dei linfociti B dei linfociti T helper follicolari nei follicoli
CXCL14	BRAK		Migrazione di monociti e cellule dendritiche
CXCL16	—	CXCR6	Recettore scavenger sui macrofagi
C chemochine			
XCL1	Linfotactina	XCR1	Reclutamento di linfociti T e cellule NK
XCL2	SCM-1β	XCL1	
CX_3C chemochine			
CX_3CL1	Fractalkina	CX_3CR1	Reclutamento di linfociti T, cellule NK e monociti; attivazione delle cellule NK e dei linfociti CTL

Chemochine: struttura, regolazione e recettori

Nell'uomo sono state finora identificate circa 50 chemochine, tutte strutturalmente simili, in quanto costituite da polipeptidi di 8-10 kD contenenti 2 ponti disolfuro. Le chemochine possono essere classificate in quattro sottofamiglie sulla base del numero e della posizione dei residui di cisteina *N*-terminali responsabili dei ponti disolfuro. Le due principali famiglie sono le chemochine CC (o β), in cui i primi due residui di cisteina sono adiacenti, e le CXC (o α), in cui gli stessi residui sono separati da un aminoacido. Queste differenze sono associate alla segregazione delle due sottofamiglie in due gruppi di geni separati. Un numero limitato di chemochine possiede o un solo residuo di cisteina (famiglia C) o due residui di cisteina, ma separati da 3 aminoacidi (famiglia CX_3C). Inizialmente a ogni chemochina venne assegnato un nome in base al modo in cui era stata identificata o al tipo di risposte biologiche che era in grado di attivare. Recentemente è stata introdotta una nomenclatura basata principalmente sul tipo di recettore utilizzato da ogni chemochina (vedi Tab. 3-2). Nonostante esistano eccezioni, il processo di reclutamento dei neutrofili è principalmente mediato dalle chemochine CXC, quello dei monociti dipende

in larga parte dalle chemochine CC, mentre il reclutamento dei linfociti è mediato dalle chemochine sia CXC sia CC.

Le chemochine delle sottofamiglie CC e CXC sono prodotte dai leucociti e da diversi tipi cellulari, quali cellule endoteliali, cellule epiteliali e fibroblasti. Nella maggior parte dei casi, la produzione di chemochine è innescata dal riconoscimento di microrganismi attraverso l'attivazione di vari recettori espressi dalle cellule dell'immunità innata (discussi nel Capitolo 4). Inoltre, le chemochine vengono anche prodotte in risposta a citochine infiammatorie, tra cui IL-1, IL-17 e TNF. Numerose chemochine CC sono anche prodotte da linfociti T stimolati dall'antigene e svolgono quindi un importante ruolo di integrazione tra l'immunità specifica e le cellule reclutate nell'ambito del processo infiammatorio.

I recettori per le chemochine appartengono alla superfamiglia dei recettori GCPR* (G-Protein-Coupled Receptors) *a 7 domini transmembrana associati alle proteine che legano il guanosintrifosfato* (GTP-binding protein) *note come proteine G. Questi recettori trasducono il segnale attraverso proteine G eterotrimeriche a loro associate. Le proteine G stimolano cambiamenti nell'organizzazione del citoscheletro e inducono la polimerizzazione dei filamenti di actina e miosina, un fenomeno che è funzionale all'aumento della motilità cellulare. Come discusso in precedenza, questi segnali mutano anche la conformazione delle integrine aumentandone l'affinità per i ligandi. In seguito al legame con le chemochine, l'espressione dei recettori per le chemochine viene rapidamente ridotta e questo è un meccanismo molto semplice e veloce di controllo della risposta biologica.

I recettori per le chemochine sono espressi in combinazioni diverse nelle varie sottopopolazioni leucocitarie, determinando un profilo di migrazione unico per i vari tipi cellulari. Sono stati finora identificati 10 diversi recettori per le chemochine CC (denominati CCR1-CCR10), 6 per le chemochine CXC (denominati CXCR1-CXCR6) e uno per la chemochina CX_3CL1 (chiamato CX_3CR1) (vedi Tab. 3-2). I recettori per le chemochine sono espressi su tutti i tipi cellulari; i linfociti T presentano il più ampio e variegato spettro di espressione rispetto alle altre cellule. I recettori hanno una notevole promiscuità per le chemochine appartenenti a una stessa sottofamiglia e la specificità della risposta cellulare è determinata più che altro dal profilo di espressione dei recettori. Alcuni recettori per le

chemochine, in particolare CCR5 e CXCR4, agiscono da corecettori per il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) (vedi Cap. 21).

Attività biologiche delle chemochine

Alcune delle chemochine coinvolte nelle reazioni infiammatorie sono prodotte in risposta a stimoli esogeni, mentre altre, che regolano la migrazione attraverso i tessuti, sono prodotte costitutivamente da cellule presenti negli stessi tessuti. Le principali funzioni delle chemochine sono volte a migliorare l'adesione all'endotelio dei leucociti circolanti attraverso l'attivazione delle integrine e la stimolazione della migrazione direzionale nei tessuti, definita chemiotassi.

- ***Le chemochine svolgono un ruolo essenziale nel reclutamento dei leucociti circolanti ai siti extravascolari***. Il processo di reclutamento dei leucociti dal sangue verso i tessuti è regolato dall'azione di più chemochine. Diverse chemochine agiscono su cellule diverse e, in associazione con i diversi tipi di molecole di adesione, controllano la natura dell'infiltrato infiammatorio. Nell'ambito del processo infiammatorio le chemochine assolvono a due funzioni.
  - ***Aumentata adesione dei leucociti all'endotelio***. Le chemochine prodotte a livello tissutale si legano agli eparansolfati proteoglicani presenti sulla superficie delle cellule endoteliali delle venule postcapillari. Le chemochine così legate sono esposte per il riconoscimento da parte dei leucociti che hanno aderito alla superficie endoteliale tramite le molecole di adesione. Questo meccanismo contribuisce a creare un'elevata concentrazione locale di chemochine, consentendo loro di legarsi ai recettori presenti sui leucociti. L'attivazione dei recettori per le chemochine provoca l'aumento dell'affinità delle integrine e l'adesione salda dei leucociti, che è una fase critica nel processo di extravasazione e reclutamento tissutale.
  - ***Migrazione dei leucociti sul sito di infezione o di danno tissutale***. Le chemochine prodotte nei tessuti extravascolari agiscono sui leucociti che hanno abbandonato il circolo e stimolano il movimento dei leucociti lungo un gradiente di concentrazione verso il sito di produzione; tale processo prende il nome di

chemiotassi. In questo modo, i leucociti riescono a migrare verso le cellule infette e danneggiate presenti nei tessuti.

- ***Le chemochine sono anche coinvolte nello sviluppo degli organi linfoidi mediante la loro capacità di indirizzare la localizzazione dei leucociti e di altre cellule in aree diverse degli organi linfoidi secondari***. La funzione delle chemochine nell'organizzazione anatomica dei tessuti linfoidi è già stata discussa nel Capitolo 2.
- ***Le chemochine sono cruciali per la migrazione delle cellule dendritiche dai focolai di infezione ai linfonodi drenanti***. Le cellule dendritiche sono attivate da organismi microbici nei tessuti periferici e successivamente migrano nei linfonodi per "informare" i linfociti T della presenza dell'infezione (vedi Cap. 6). Questa migrazione dipende dall'espressione di un recettore per le chemochine, CCR7, che viene espresso in seguito all'incontro di un microbo da parte della cellula dendritica. Il CCR7 lega una chemochina prodotta dall'endotelio linfatico presente nei tessuti, promuovendo in tal modo il movimento della cellula dendritica nei vasi linfatici fino ai linfonodi. Una volta giunte nei linfonodi, le cellule dendritiche sono indirizzate dalla stessa chemochina nelle aree interfollicolari, dove migrano anche i linfociti T naïve in risposta agli stessi segnali. Questo spiega perché le cellule dendritiche e i linfociti T naïve co-localizzano nelle stesse aree linfonodali favorendo la presentazione dell'antigene ai linfociti T.

INTERAZIONI LEUCOCITI-CELLULE ENDOTELIALI E RECLUTAMENTO DEI LEUCOCITI NEI TESSUTI

Le selectine, le integrine e le chemochine funzionano in concerto per regolare le interazioni tra leucociti e cellule endoteliali, necessarie per la migrazione dei leucociti nei tessuti. Gli studi di adesione condotti *in vitro* in condizioni che simulano il flusso ematico e *in vivo*, mediante microscopia intravitale, hanno permesso di elucidare la sequenza di eventi che

caratterizzano il processo di reclutamento dei leucociti nella maggior parte dei tessuti (Fig. 3-3). Questi eventi possono essere riassunti come segue.

- ***Rolling (rotolamento) dei leucociti sull'endotelio mediato dalle selectine.*** Le cellule endoteliali che rivestono le venule post-capillari sono attivate in risposta ai microbi, alle citochine (tra cui TNF e IL-1) prodotte dai macrofagi e da altre cellule tissutali che incontrano i microbi e da altri mediatori, come istamina e trombina, che vengono prodotti nel corso delle reazioni infiammatorie. Le citochine stimolano l'espressione della E-selectina, mentre altri mediatori inducono l'espressione in superficie della P-selectina. I focolai infiammatori sono caratterizzati da vasodilatazione e rallentamento del flusso ematico. Di conseguenza, i leucociti, avendo dimensioni maggiori degli eritrociti, tendono a spostarsi dal flusso assiale verso il rivestimento vascolare, nel cosiddetto processo di marginazione. Questo consente ai ligandi della E-selectina e della P-selectina espressi sui microvilli dei leucociti di interagire con le selectine espresse dalle cellule endoteliali. Le interazioni selectina-ligando sono a bassa affinità (K_d ~100 μM), caratterizzate da una rapida cinetica di dissociazione e facilmente dissipate dalla forza della pressione sanguigna. Come risultato, i leucociti si distaccano e si legano ripetutamente, iniziando a rotolare lungo la superficie dell'endotelio. Questo rallentamento favorisce i successivi passi di questo processo sequenziale.

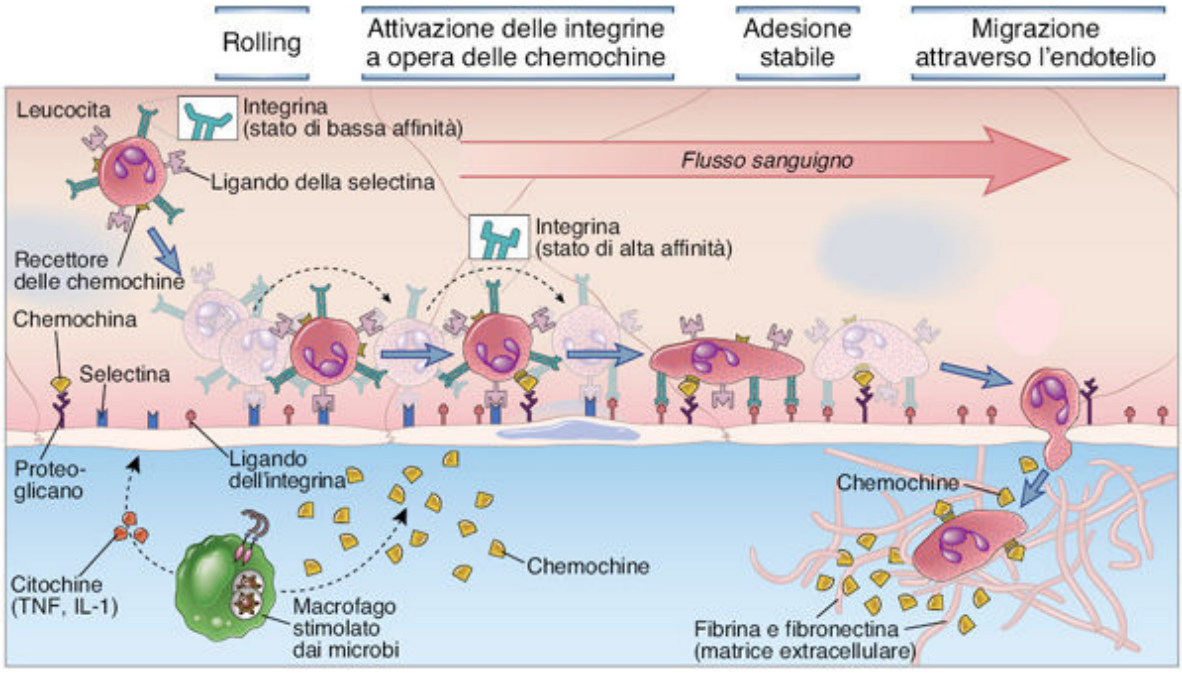


FIGURA 3-3 Il processo di reclutamento leucocitario procede per interazioni sequenziali tra leucociti e cellule endoteliali. I macrofagi che hanno incontrato un microbo nel focolaio infiammatorio producono citochine (come TNF e IL-1) che attivano le cellule endoteliali delle venule a produrre selectine, ligandi delle integrine e chemochine. Le selectine sono responsabili della debole interazione tra leucociti e cellule endoteliali, che determina il fenomeno del rolling. Le chemochine prodotte nel tessuto infettato o dalle cellule endoteliali si legano alla superficie delle cellule endoteliali e interagiscono con i rispettivi recettori espressi dai leucociti che stanno effettuando il rolling, con la conseguente attivazione delle integrine. Le integrine, una volta assunto lo stato di alta affinità, legano i rispettivi ligandi, che appartengono alla superfamiglia delle Ig, espressi sulla superficie delle cellule endoteliali, e promuovono l'adesione salda dei leucociti sull'endotelio. A questo punto, i leucociti procedono sino alle giunzioni presenti tra una cellula endoteliale e l'altra e migrano attraverso la parete vascolare. Neutrofili, monociti e linfociti T utilizzano essenzialmente gli stessi meccanismi per migrare dal sangue ai tessuti.

- ***Aumento dell'affinità delle integrine a opera delle chemochine***. Durante il processo di rolling (rotolamento), le chemochine espresse dalle cellule endoteliali delle venule post-capillari presenti nei siti di infezione si legano ai rispettivi recettori espressi dai leucociti. Come esposto in precedenza, questo determina un rafforzamento del legame dei leucociti alla superficie endoteliale.
- ***Adesione stabile dei leucociti all'endotelio mediata dalle integrine***. Parallelamente all'attivazione delle integrine, le citochine infiammatorie e i prodotti microbici presenti nel sito di infezione aumentano l'espressione dei relativi ligandi. Questi comprendono VCAM-1, che lega VLA-4, e ICAM-1, che lega le integrine LFA-1 e

Mac-1. Questo processo consente una salda adesione e l'appiattimento dei leucociti all'endotelio e la riorganizzazione del loro citoscheletro.

- ***Transmigrazione dei leucociti attraverso l'endotelio.*** Spesso i leucociti transmigrano attraverso gli spazi di giunzione delle cellule endoteliali. Questo processo coinvolge le integrine leucocitarie e i loro ligandi espressi dalle cellule endoteliali, oltre ad altre proteine tra cui CD31, espressa sia dai leucociti sia dall'endotelio. Questo processo richiede l'interruzione temporanea e transitoria delle giunzioni tra le cellule endoteliali che sono costituite principalmente dai complessi di VE-caderina. I meccanismi responsabili di tale azione coinvolgono l'attivazione di proteine chinasi, che si attivano quando le integrine leucocitarie legano ICAM-1 e VCAM-1. Queste proteine chinasi fosforilano le code citoplasmatiche della VE-caderina con la conseguente alterazione della struttura adesiva. Più raramente, i leucociti sono stati visti attraversare le cellule endoteliali, piuttosto che passare tra l'una e l'altra. Questo processo, non del tutto chiaro, è chiamato *migrazione transcellulare*.

Queste fasi si osservano nella migrazione attraverso l'endotelio di tutti i leucociti. Tuttavia, i neutrofili, i monociti e diverse popolazioni di linfociti si distinguono per il tessuto in cui migrano e la loro cinetica di migrazione in condizioni sia infiammatorie sia omeostatiche. Questa specificità deriva dall'espressione di diverse combinazioni di molecole di adesione e recettori delle chemochine, come vedremo in seguito in maggior dettaglio.

La conferma del ruolo cruciale svolto da selectine, integrine e chemochine nel processo di reclutamento cellulare è fornito da studi condotti in topi geneticamente modificati e in rare patologie umane ereditarie note con il nome collettivo di *sindrome da deficit di adesione leucocitaria*. Per esempio, i topi privi di fucosiltransferasi, l'enzima necessario per la sintesi dei carboidrati che si legano alle selectine, mostrano un grave difetto nel reclutamento leucocitario e nella capacità di montare risposte immunitarie. In modo analogo, i soggetti che sono privi del trasportatore del fucosio localizzato nell'apparato del Golgi, necessario per sintetizzare i carboidrati che legano la E- e la P-selectina, mostrano difetti che vengono identificati come *sindrome da deficit di adesione leucocitaria-2* (*Leukocyte Adhesion Deficiency-2*, LAD-2) (vedi Cap. 21). Ancora, un'immunodeficienza

autosomica recessiva a carico del gene CD18, che codifica per la subunità β di LFA-1 e Mac-1, è la causa di una patologia chiamata *deficit di adesione leucocitaria-1* (*Leukocyte Adhesion Deficiency-1*, LAD-1), caratterizzata da infezioni batteriche e fungine ricorrenti, difetto nel reclutamento dei neutrofili nei siti di infezione e compromissione di quelle funzioni linfocitarie che necessitano dell'adesione cellulare. Alcune rare mutazioni in elementi della trasduzione del segnale coinvolti nell'attivazione delle integrine da parte dei recettori per le chemochine causano anch'esse difetti nell'adesione e nel reclutamento leucocitario, con conseguente diminuzione delle reazioni di difesa nei confronti delle infezioni, sindrome definita "da deficit di adesione leucocitaria di tipo 3" (LAD-3).

MIGRAZIONE DI NEUTROFILI E MONOCITI VERSO SITI DI INFEZIONE O DI DANNO TISSUTALE

Dopo la maturazione nel midollo osseo, i neutrofili e i monociti entrano nel torrente ematico e iniziano a circolare in tutti i tessuti. Il loro ruolo di cellule fagocitiche coinvolte nell'eliminazione dei microbi e delle cellule morte ha luogo solo una volta raggiunti i focolai infettivi in sede extravascolare, sebbene queste cellule possano svolgere alcune loro funzioni anche a livello ematico.

I neutrofili e i monociti circolanti sono reclutati nei tessuti sede di infezioni e di danno attraverso un processo che coinvolge in modo sequenziale l'azione delle selectine, delle chemochine e delle integrine che segue le regole comuni del reclutamento leucocitario precedentemente discusse. Come vedremo in modo più approfondito nel Capitolo 4, i neutrofili sono la prima popolazione leucocitaria che viene reclutata dal sangue nei focolai infiammatori. Il reclutamento dei monociti avviene nelle ore successive allo stimolo flogistico e continua nei giorni successivi, anche quando il reclutamento dei neutrofili è cessato. Inoltre, in alcuni tessuti, i neutrofili non vengono reclutati e sono presenti solo i monociti. Questo diverso comportamento riflette le differenze nell'espressione delle molecole di adesione e dei recettori per le chemochine da parte dei neutrofili rispetto

ai monociti. I neutrofili esprimono CXCR1 e CXCR2, che legano chemochine della famiglia di GRO tra cui CXCL8 (IL-8), la principale chemochina responsabile del reclutamento tissutale dei neutrofili (vedi Tab. 3-2). Il reclutamento iniziale dei neutrofili è la conseguenza della produzione precoce e abbondante di CXCL8 da parte dei macrofagi residenti nei focolai infiammatori. Diversamente dai neutrofili, i monociti classici, che rappresentano la principale popolazione reclutata nei siti infiammatori, esprimono CCR2. Questo recettore lega diverse chemochine, di cui la più importante per i monociti è CCL2 (MCP-1). Quindi, il reclutamento dei monociti avviene quando le cellule residenti nei tessuti infettati esprimono CCL2. I monociti non classici non esprimono CCR2 ma CX_3CR1, il recettore per CX_3CL1, detta anche fractalchina, una chemochina che può essere espressa sia in forma solubile sia in una forma associata alla membrana che è coinvolta nell'adesione dei monociti alle cellule endoteliali.

MIGRAZIONE E RICIRCOLAZIONE DEI LINFOCITI T

I linfociti migrano in continuazione fra il torrente ematico, i vasi linfatici, i tessuti linfoidi secondari e i tessuti non linfoidi periferici. Popolazioni di linfociti distinte si muovono tra questi luoghi con vie di circolazione differenti (Fig. 3-4). Quando un linfocita T naïve fuoriesce dal timo ed entra nel circolo ematico, viene indirizzato nei linfonodi, nella milza o nel tessuto linfoide associato alle mucose dove si localizza nelle aree T. In caso di mancato riconoscimento dell'antigene, il linfocita T lascia il linfonodo, o il tessuto mucosale, attraverso il circolo linfatico, per ritornare al circolo ematico. Una volta ritornato in circolo, il linfocita T naïve ripete il proprio ciclo di homing ai tessuti linfoidi secondari. Questo processo, chiamato **ricircolazione linfocitaria**, fa sì che i pochi linfociti naïve specifici per un particolare antigene aumentino la probabilità di incontrare l'antigene per cui sono specifici, se questo è presente nell'organismo. I linfociti effettori e della memoria possono ritornare nel torrente ematico e migrare nei tessuti periferici, sede dei processi flogistici e/o infettivi.

Alcune sottopopolazioni di linfociti effettori si dirigono preferenzialmente in alcuni distretti, come la cute o l'intestino (vedi Cap. 14). L'esistenza di diversi meccanismi di homing assicura che le differenti sottopopolazioni linfocitarie si localizzino nei microambienti tissutali dove è necessaria la loro azione per fronteggiare un'infezione, evitando che si disperdano dove non è richiesta la loro presenza. Nel paragrafo seguente verranno descritti i meccanismi di homing e le vie di ricircolazione dei linfociti. La nostra descrizione si concentrerà soprattutto sui linfociti T, per i quali sono disponibili molte più informazioni rispetto ai linfociti B, ma molti dei meccanismi sono apparentemente condivisi da entrambi i tipi cellulari.

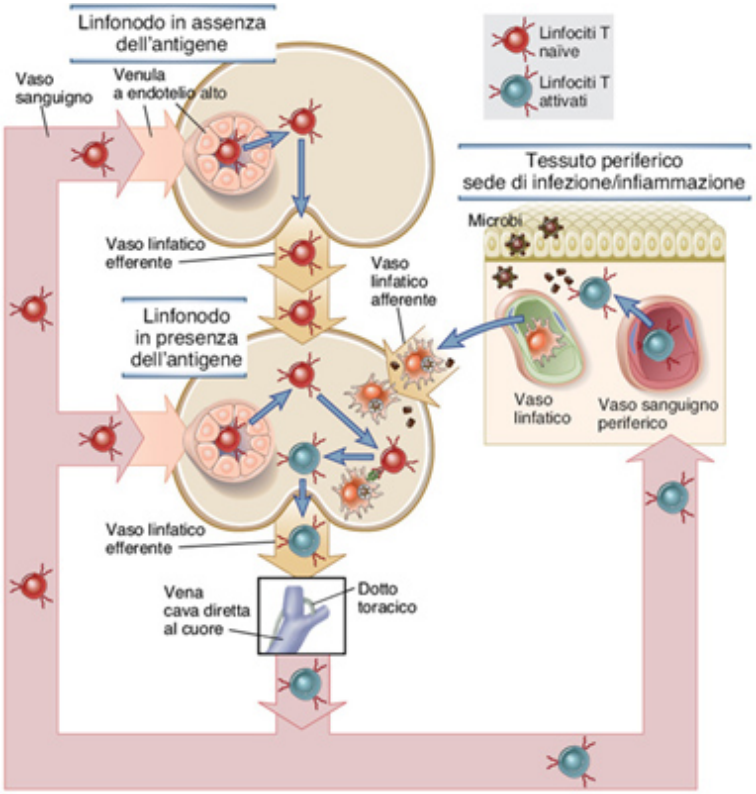


FIGURA 3-4 Ricircolazione dei linfociti T. I linfociti T naïve abbandonano il sangue per entrare nei linfonodi preferenzialmente attraverso le venule a endotelio alto. Le cellule dendritiche che trasportano gli antigeni entrano nei linfonodi attraverso i vasi linfatici. Se i linfociti T riconoscono l'antigene, si attivano e ritornano in circolo attraverso i vasi linfatici efferenti che confluiscono nel dotto toracico, il quale si riversa nella vena cava superiore, poi nel cuore e infine nella circolazione arteriosa. I linfociti T effettori e della memoria abbandonano il sangue per entrare preferenzialmente nei tessuti periferici attraverso le venule presenti nei siti di infiammazione. La figura non mostra la ricircolazione attraverso gli organi linfoidi secondari diversi dai linfonodi.

Ricircolazione dei linfociti T naïve tra il sangue e gli organi linfoidi secondari

La ricircolazione dei linfociti si basa sull'insieme dei meccanismi che governano il passaggio dei linfociti T naïve dal sangue ai linfonodi e dei segnali molecolari che regolano la loro fuoriuscita dai linfonodi. Questi due meccanismi verranno qui discussi individualmente.

Migrazione dei linfociti T naïve ai linfonodi

I meccanismi che determinano l'ingresso dei linfociti T naïve ai linfonodi sono estremamente efficienti, con un afflusso che raggiunge le 25×10^9 cellule al giorno. Questo significa che ogni linfocita passa attraverso lo stesso linfonodo in media una volta al giorno. Il processo infiammatorio di un tessuto periferico provoca un aumento dell'afflusso di sangue ai linfonodi e conseguentemente un forte aumento dell'afflusso dei linfociti T ai linfonodi che drenano il focolaio infiammatorio, mentre contemporaneamente si riduce la fuoriuscita delle cellule T attraverso i vasi linfatici efferenti. Il meccanismo responsabile di questa ritenzione momentanea, che verrà discussa più avanti, comporta che il tempo di permanenza dei linfociti T nei linfonodi che drenano un tessuto infiammato sia superiore a quello che si osserva in condizioni di normalità. Gli antigeni proteici vengono concentrati nei linfonodi e negli altri organi linfoidi secondari, dove vengono presentati ai linfociti T dalle cellule dendritiche, il tipo di cellula che presenta l'antigene più efficace nell'attivazione delle risposte dei linfociti T naïve (vedi Cap. 6). Pertanto, il ricircolo e il trattenimento momentaneo dei linfociti T naïve attraverso gli organi linfoidi secondari, insieme alla concentrazione dell'antigene che avviene in questi organi, permettono di ottimizzare la probabilità che queste cellule incontrino l'antigene per cui sono specifiche e diano inizio a una risposta adattativa.

L'homing dei linfociti T nei linfonodi e nei tessuti linfoidi associati alle mucose avviene a livello di venule postcapillari specializzate, le HEV, localizzate nelle aree T dei linfonodi. I linfociti T naïve arrivano ai tessuti linfoidi secondari attraverso il flusso sanguigno arterioso, lasciando il circolo e migrando nello stroma dei linfonodi attraverso le HEV. Questi vasi sono ricoperti da cellule endoteliali cubiche, invece che dalle cellule endoteliali

piatte tipiche delle altre venule (Fig. 3-5). Le HEV sono presenti anche nei tessuti linfoidi associati alle mucose, come le placche di Peyer nell'intestino, ma sono assenti nella milza. Queste venule esprimono sulla loro superficie particolari molecole di adesione e chemochine (descritte più avanti), che permettono l'homing selettivo di alcune popolazioni linfocitarie. Lo sviluppo delle caratteristiche morfologiche delle HEV dipende dalla presenza di citochine, come la linfotossina. In realtà, le HEV si possono sviluppare anche in siti di infiammazione cronica extralinfoidi, dove vengano prodotte in modo persistente le citochine necessarie per il loro sviluppo.

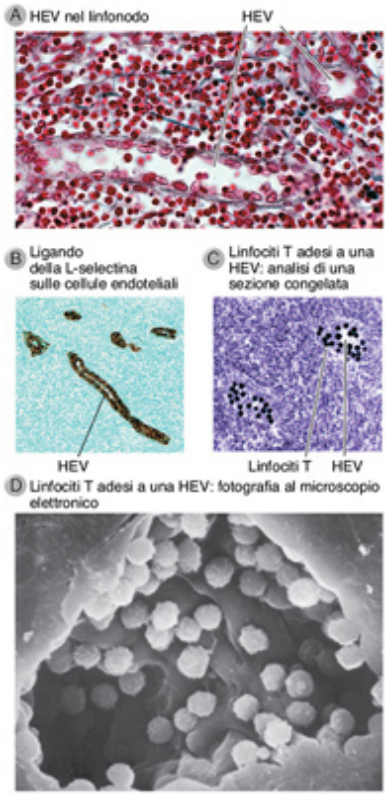


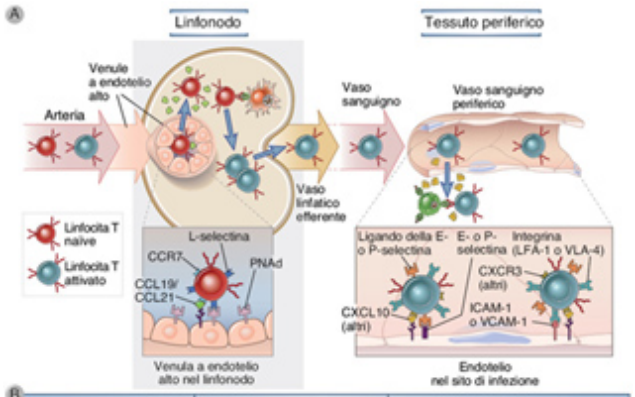
FIGURA 3-5 Venule a endotelio alto (HEV). A. Fotografia ottenuta al microscopio ottico che evidenzia le grandi dimensioni delle cellule endoteliali di una HEV linfonodale. (*Per gentile concessione del Dr. Steve Rosen, Department of Anatomy, University of California, San Francisco*.) **B.** Espressione del ligando della L-selectina da parte delle cellule delle HEV. La colorazione è stata effettuata con un anticorpo specifico con la tecnica dell'immunoperossidasi. (La presenza dell'anticorpo viene rilevata mediante un prodotto di reazione della perossidasi di colore scuro; vedi Appendice III per i dettagli.) Le HEV sono abbondanti nelle aree T linfonodali. (*Per gentile concessione del Dr. Steve Rosen e del Dr. Akio Kikuta, Department of Anatomy, University of California, San Francisco*.) **C.** Legame selettivo dei linfociti alle HEV in sezioni congelate di linfonodo. (*Per gentile concessione del Dr. Steve Rosen, Department of Anatomy, University of California, San Francisco*.) **D.** Fotografia ottenuta al microscopio elettronico a scansione di una HEV che mostra linfociti adesi alla superficie luminale delle cellule endoteliali. (*Per gentile concessione di J. Emerson e T. Yednock, University of California San Francisco School of Medicine, San Francisco. Da Rosen SD, Stoolman LM: Potential role of cell surface lectin in lymphocyte recirculation. In Olden K, Parent J [Eds.]: Vertebrate lectins. New York, 1987, Van Nostrand Reinhold*.)

La migrazione dei linfociti T naïve dal sangue, attraverso le HEV, al parenchima dei linfonodi è un processo a stadi successivi, che consiste nel rolling mediato dalle selectine, nell'attivazione delle integrine in seguito al riconoscimento delle chemochine, nell'adesione ferma all'endotelio vascolare e nella trasmigrazione attraverso la parete del vaso. Questo processo comprende gli eventi sequenziali descritti in precedenza per la migrazione di tutti i leucociti (vedi Fig. 3-3), ma alcune delle molecole coinvolte sono relativamente specifiche per l'homing linfonodale dei linfociti T naïve (Fig. 3-6).

- Il rolling dei linfociti T naïve sulle HEV degli organi linfoidi secondari è mediato dalla L-selectina dei linfociti, che lega sulle HEV il carboidrato chiamato PNAd. Il PNAd che lega la L-selectina può essere associato a diverse sialomucine sulle HEV presenti in diversi tessuti. Per esempio, nei linfonodi il PNAd è associato a due sialomucine chiamate GlyCAM-1 (*Glycan-bearing Cell Adhesion Molecule-1*, molecola-1 di adesione cellulare che contiene glicano) e CD34. Nelle placche di Peyer della parete intestinale, il ligando della L-selectina è una molecola chiamata MadCAM-1 (*Mucosal addressin Cell Adhesion Molecule-1*, molecola-1 di adesione cellulare e addressina mucosale).
- Analogamente alla migrazione leucocitaria in altri siti, la fase successiva al rolling consiste nell'adesione salda deilinfociti T alle HEV ed è mediata dalle integrine, soprattutto dalla LFA-1.

- Le chemochine che attivano l’affinità delle integrine dei linfociti T naïve sono CCL19 e CCL21, che sono responsabili dell’homing leucocitario nelle aree T dei tessuti linfoidi (vedi Cap. 2). La principale fonte di CCL19 e CCL21 sono i fibroblasti reticolari delle aree T linfonodali e CCL19 è anche prodotto in modo costitutivo dalle HEV. Queste chemochine sono espresse sulla superficie delle HEV e vengono riconosciute dai linfociti in fase di rolling. Entrambe queste chemochine si legano al recettore CCR7, che è espresso ad alti livelli dai linfociti naïve. L’attivazione di CCR7 assicura l’aumento dell’avidità delle integrine e l’adesione salda alle HEV dei linfociti T naïve. Si noti che CCR7 regola anche la migrazione delle cellule dendritiche ai linfonodi attraverso il circolo linfatico.

L’importanza della L-selectina e delle chemochine nel processo di homing dei linfociti nei tessuti linfoidi secondari è confermata da molteplici osservazioni sperimentali. I linfociti dei topi knockout per la L-selectina non si legano alle HEV dei linfonodi periferici; anche questo determina una marcata riduzione del numero dei linfociti in questi organi. I linfonodi dei topi geneticamente deficitari per CCL19, CCL21 o CCR7 contengono pochissimi linfociti T naïve.



B

Recettore di homing dei linfociti T	Ligando sulla cellula endoteliale	Funzione dell'interazione recettore: ligando
Linfociti T naïve		
L-selectina	PNAd	Adesione iniziale debole dei linfociti T naïve alle venule a endotelio alto nel linfonodo
CCR7	CCL19 o CCL21	Attivazione delle integrine e chemotassi
LFA-1 (β2-integrina)	ICAM-1	Arresto sulle cellule a endotelio alto nel linfonodo
Linfociti T attivati (effettori e della memoria)		
Ligando della E- e P-selectina	E- e P-selectina	Adesione iniziale debole dei linfociti T effettori e della memoria all'endotelio attivato dalle citochine nel sito periferico di infezione
CXCR3	CXCL10 (altri)	Attivazione di integrine e chemiotassi
CCR5	CCL4 (altri)	Attivazione di integrine e chemiotassi
LFA-1 (β2-integrina) o VLA-4 (β1-integrina)	ICAM-1 or VCAM-1	Arresto saldo su endotelio attivato da citochine nei siti di infezione

FIGURA 3-6 Le molecole coinvolte nella migrazione dei linfociti T naïve ed effettori. A. I linfociti T naïve si localizzano nei linfonodi in seguito al legame della L-selectina alle addressine dei linfonodi periferici (PNAd) espressi dalle HEV, presenti selettivamente negli organi linfoidi secondari. In questo processo entrano in gioco anche le chemochine CCL19 e CCL21, anch'esse espresse dalle HEV. I linfociti T attivati, compresi i linfociti T effettori, si localizzano nei tessuti periferici sede dei processi flogistici; questa migrazione è mediata dalle E- e P-selectine, dalle integrine e dalle chemochine prodotte nei siti di infezione. Anche altre chemochine e altri recettori per le chemochine, oltre a quelli mostrati, sono coinvolti nella migrazione dei linfociti T effettori e della memoria. **B.** La figura mostra le molecole di adesione, le chemochine e i recettori per le chemochine coinvolti nella migrazione dei linfociti T effettori e della memoria.

Egressione dei linfociti T dai linfonodi

I linfociti T naïve che non riconoscono l'antigene a livello linfonodale non si attivano e ritornano in circolo. Il ritorno nel torrente ematico completa il percorso della ricircolazione e dà ai linfociti T naïve la possibilità di cercare nuovamente l'antigene in altri linfonodi. La principale via per il ritorno nel sangue è tramite i vasi linfatici efferenti, che può comportare il passaggio attraverso linfonodi successivi presenti lungo lo stesso vaso, e successivamente il dotto toracico che porta alla vena cava superiore.

La fuoriuscita dei linfociti T naïve dai linfonodi dipende da un chemoattraente lipidico chiamato sfingosina-1-fosfato (*Sphingosine 1-Phosphate, *S1P) che lega un recettore specifico chiamato S1PR1 (*Sphingosine 1-Phosphate Receptor*) espresso dai linfociti T (Fig. 3-7). La S1P è presente a concentrazioni più elevate nel sangue e nella linfa rispetto ad altri tessuti. Questo gradiente di concentrazione è mantenuto grazie all'azione di un enzima che degrada la S1P, la S1Pliasi. Questo enzima è espresso nella maggioranza dei tessuti, in modo tale che la concentrazione di S1P nei tessuti sia inferiore di quella presente nel circolo linfatico ed ematico. L'S1PR1 è un recettore accoppiato alle proteine G. I segnali generati nei linfociti T naïve in seguito al legame della S1P alla S1PR1 stimolano la migrazione direzionale dei linfociti lungo un gradiente di concentrazione, facendoli uscire dal parenchima del linfonodo. I linfociti T naïve circolanti esprimono bassi livelli di S1PR1, perché l'elevata concentrazione ematica di S1P causa l'internalizzazione del recettore. Il linfocita T naïve che entra in un linfonodo trova una bassa concentrazione di S1P, che favorisce nelle ore successive la riespressione in membrana di S1PR1. In questo lasso di tempo il linfocita T naïve può interagire con le cellule che presentano l'antigene. In seguito all'espressione del recettore per la S1PR1, il linfocita T abbandona il linfonodo seguendo il gradiente di concentrazione della S1P presente nel circolo linfatico efferente.

Se un linfocita T naïve si attiva in seguito al riconoscimento dell'antigene, la riespressione di S1PR1 viene inibita per diversi giorni, aumentando il tempo di permanenza del linfocita nel tessuto linfoide. Tale inibizione è in parte dovuta all'azione degli interferoni di tipo I, una famiglia di citochine espressa nel corso delle risposte innate causate da processi infettivi, come vedremo nel Capitolo 4. La stimolazione da parte dell'antigene e l'azione degli interferoni provocano l'espressione di una proteina di membrana, chiamata CD69, che si lega a S1PR1 e ne riduce l'espressione sulla superficie cellulare. In tal modo, il linfocita T attivato diventa temporaneamente insensibile al gradiente della S1P. Questo processo consente ai linfociti T attivati dall'antigene di permanere nell'organo linfoide e andare incontro a espansione clonale e differenziazione in linfociti T effettori, processo che può richiedere anche diversi giorni. Quando la differenziazione in cellule effettrici è completa, le cellule perdono CD69,

riesprimono S1PR1 e, pertanto, diventano responsive al gradiente di concentrazione di S1P che ne causa la fuoriuscita dal linfonodo.

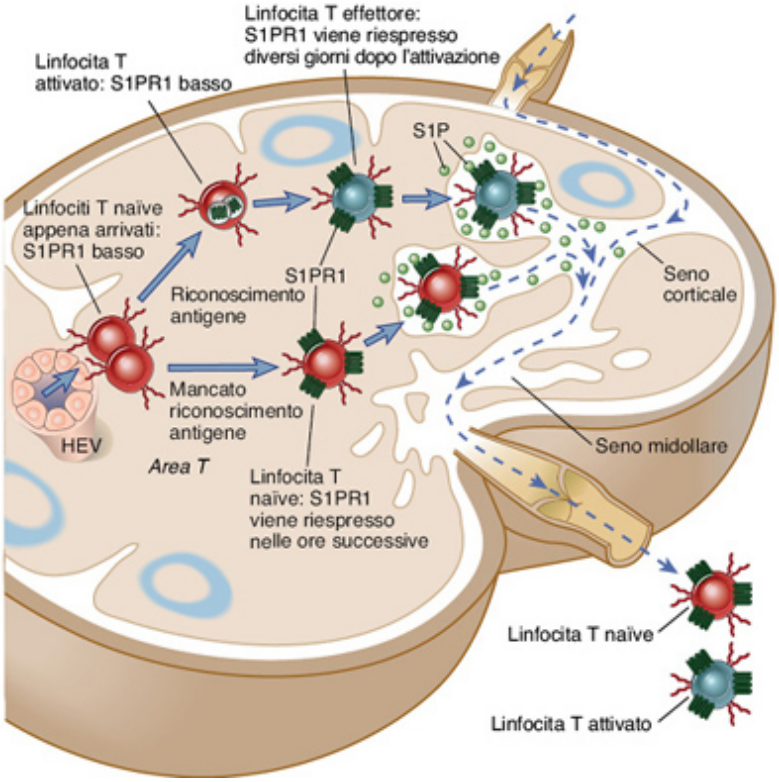


FIGURA 3-7 Meccanismi di fuoriuscita dei linfociti dagli organi linfoidi. I linfociti T naïve che sono appena arrivati nel linfonodo non possono riconoscere il gradiente di concentrazione di S1P che esiste tra le regioni T e la linfa del seno midollare. Dopo alcune ore, per i linfociti naïve, o giorni, per i linfociti T che si sono attivati e differenziati, il recettore S1PR1 torna a essere espresso e le cellule possono lasciare il linfonodo seguendo il gradiente della S1P.

S1P e S1PR1 sono anche coinvolte nell'egressione dei linfociti T naïve maturi dal timo e nella fuoriuscita dei linfociti B attivati secernenti anticorpi dagli organi linfoidi secondari.

Le nostre conoscenze sul ruolo di S1P e S1PR1 nella migrazione dei linfociti T deriva in larga misura dagli studi condotti su un farmaco chiamato fingolimod (FTY20) in grado di legarsi a S1PR1 e inibire la sua espressione in membrana. Il fingolimod blocca la fuoriuscita dei linfociti T dagli organi linfoidi e agisce come un potente immunosoppressore. L'utilizzo di questo farmaco è stato approvato per il trattamento della sclerosi multipla, una malattia autoimmune del sistema nervoso centrale, e oggi è sperimentato, insieme ad altri composti che possiedono un simile meccanismo d'azione,

anche per il trattamento di altre patologie autoimmuni e per inibire il rigetto degli organi trapiantati. Ulteriori indicazioni sperimentali che sottolineano l'importante ruolo della S1P nella migrazione dei linfociti T naïve sono state ottenute studiando topi geneticamente difettivi per S1PR1. In questi topi, si osserva un difetto nella capacità dei linfociti T di fuoriuscire dal timo e di popolare gli organi linfoidi secondari. Se si iniettano linfociti T privi di questo recettore in topi normali, le cellule entrano nei linfonodi, ma non riescono a uscirne.

Ricircolazione dei linfociti T attraverso altri organi linfoidi

Il processo di homing dei linfociti T naïve nei tessuti linfoidi associati all'intestino, come le placche di Peyer e i linfonodi mesenterici, è fondamentalmente simile a quello dei linfonodi e si basa sull'interazione dei linfociti T con le HEV. Come in altri tessuti, queste interazioni sono mediate da selectine, integrine e chemochine. Una caratteristica peculiare dell'homing dei linfociti T naïve all'intestino è costituita dal ruolo svolto da una molecola della superfamiglia delle Ig, MadCAM-1, esclusivamente espressa sulle HEV dei tessuti linfoidi associati alle mucose. I linfociti T naïve esprimono due molecole che legano MadCAM-1, l'L-selectina e l'integrina $\alpha_4\beta_7$, entrambe coinvolte nel rolling dei linfociti T naïve durante l'homing nei tessuti linfoidi associati all'intestino.

La migrazione dei linfociti T naïve nella milza non è regolata così finemente come nei linfonodi. La milza non ha strutture come le HEV e sembra che i linfociti T naïve vadano ai seni della zona marginale e della polpa rossa attraverso meccanismi che non coinvolgono le selectine, le integrine o le chemochine; tuttavia, le chemochine che legano CCR7 guidano la localizzazione dei linfociti T naïve nella polpa bianca. Anche se l'homing nella milza apparentemente è meno finemente regolato di quello ai linfonodi, il passaggio dei linfociti attraverso la milza è comunque molto veloce; infatti circa la metà di tutta la popolazione linfocitaria attraversa la milza ogni 24 ore.

Migrazione dei linfociti T effettori verso i siti di infiammazione

I linfociti T effettori, che si sono differenziati in seguito al riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti T naïve, fuoriescono dagli organi linfoidi

secondari attraverso il circolo linfatico per ritornare nel sangue. Molte delle funzioni antimicrobiche dei linfociti T effettori devono necessariamente essere svolte localmente al sito di infezione e quindi queste cellule devono essere in grado di abbandonare gli organi linfoidi. Durante la loro differenziazione da linfociti T naïve a linfociti effettori, le cellule subiscono variazioni nell'espressione dei recettori per le chemochine, S1PR1 e delle molecole di adesione che promuovono la loro egressione dai linfonodi. Dal circolo linfatico, i linfociti T effettori si riversano nel sangue e da qui potranno migrare in tutto l'organismo.

I linfociti T effettori circolanti tendono a localizzarsi principalmente nei tessuti periferici sede di processi infettivi piuttosto che nei tessuti linfoidi, a causa del loro repertorio di molecole di adesione e di recettori per le chemochine. Il processo di homing dei linfociti effettori nei tessuti sede di infezione ha luogo a livello delle venule post-capillari ed è mediato dallo stesso processo multifasico selectina-, integrina- e chemochina-dipendente descritto per altri leucociti (vedi Fig. 3-6). Come i neutrofili e i monociti, i linfociti T effettori circolanti, ma non i linfociti T naïve, esprimono i ligandi delle selectine, integrine e i recettori delle chemochine, che si legano alle selectine, ligandi di integrine e chemochine, espressi dall'endotelio attivato (vedi Fig. 3-6). L'espressione delle due molecole necessarie per l'ingresso selettivo dei linfociti T naïve negli organi linfoidi secondari attraverso la HEV (CCR7 e L-selectina) risulta invece ridotta nelle cellule effettrici, che rimangono quindi escluse dai tessuti linfoidi.

L'attivazione dei linfociti T effettori da parte degli antigeni presenti nei tessuti infiammati e la continua presenza di chemochine mantengono le integrine in uno stato di alta affinità e questo favorisce la ritenzione dei linfociti T in questi tessuti. La maggior parte delle cellule effettrici che arrivano al focolaio infettivo per svolgere le loro funzioni andranno incontro a morte.

Il linfociti T effettori sono presenti in diverse sottopopolazioni, ognuna dotata di funzioni specifiche, e che possiedono anche diverse proprietà migratorie, anche se spesso sovrapponibili. I linfociti T effettori comprendono i linfociti $CD8^+$ citotossici e i linfociti $CD4^+$ helper. I linfociti T helper (T_H) comprendono le sottopopolazioni T_H1, T_H2 e T_H17, ognuna in grado di svolgere una diversa azione protettiva antimicrobica tramite la produzione di citochine specifiche. Le caratteristiche e le funzioni di queste

cellule verranno discusse nel Capitolo 10. Per il momento, è sufficiente sapere che la migrazione di queste popolazioni mostra alcune differenze. Questo è dovuto al fatto che ogni popolazione esprime un diverso repertorio di recettori per chemochine e di molecole di adesione che ne determinano il reclutamento preferenziale nei siti infiammatori caratterizzati da diversi tipi di agenti infettivi.

Alcune cellule effettrici migrano preferenzialmente in determinati tessuti. Durante la loro maturazione negli organi linfoidi secondari, i linfociti T acquisiscono caratteristiche migratorie che permettono alle diverse sottopopolazioni di migrare selettivamente in siti diversi. Queste risposte indirizzano cellule effettrici specializzate nei siti dove possono meglio esplicare le loro funzioni di difesa contro le infezioni. L'homing alla cute e all'intestino rappresentano chiari esempi in cui popolazioni di linfociti T effettori si localizzano selettivamente in tessuti specifici attraverso l'espressione di specifiche molecole di adesione e di recettori di chemochine. È importante notare che i distinti fenotipi migratori dei linfociti T effettori sono attivati da stimoli specifici che i linfociti T naïve ricevono dalle cellule dendritiche al momento della presentazione dell'antigene nei linfonodi o nel tessuto linfoide associato all'intestino. Tratteremo ulteriormente i meccanismi del selettivo homing linfocitario nel Capitolo 14.

Migrazione dei linfociti T della memoria

I linfociti T della memoria hanno un'eterogenea modalità di espressione delle molecole di adesione e dei recettori per le chemochine e una diversa predisposizione a migrare nei tessuti periferici. Poiché abbiamo solo modi imprecisi per identificare i linfociti T della memoria (vedi Capp. 2 e 9), la distinzione tra linfociti T effettori e della memoria è spesso dubbia. Due sottopopolazioni di linfociti T della memoria, quelli della memoria centrale e quelli della memoria effettrice, già descritte in questo capitolo, sono state definite sulla base della loro diversa espressione di CCR7 e L-selectina. Nell'uomo, le cellule della memoria centrale sono presenti nel sangue come cellule $CD45RO^+$ che esprimono elevati livelli di CCR7 e di L-selectina, mentre le cellule della memoria effettrice, pur esprimendo $CD45RO^+$, possiedono bassi livelli di CCR7 e di L-selectina, ma esprimono recettori che riconoscono le chemochine infiammatorie. Questi fenotipi fanno pensare

che i linfociti T della memoria centrale si localizzino negli organi linfoidi secondari, mentre quelli della memoria effettrice si distribuiscano preferenzialmente nei tessuti periferici. Sebbene le popolazioni di linfociti T della memoria centrale ed effettrici possano essere evidenziate anche nel topo, studi sperimentali hanno evidenziato come l'espressione di CCR7 non possa in questo caso essere usata come un marcatore selettivo per distinguere le due popolazioni. Ciononostante, è fuori dubbio che alcuni linfociti T della memoria si accasino e tendano a restare negli organi linfoidi secondari, mentre altri migrano nei tessuti periferici, soprattutto in quelli mucosali. In generale, i linfociti T effettori della memoria, che sono localizzati nei tessuti periferici, rispondono alla stimolazione da parte dell'antigene producendo velocemente citochine effettrici, mentre quelli centrali, localizzati nei tessuti linfoidi, tendono a proliferare dando origine a una riserva di cellule per le risposte secondarie.

HOMING DEI LINFOCITI B

Per localizzarsi negli organi linfoidi secondari di tutto l'organismo, i linfociti B naïve utilizzano gli stessi meccanismi usati dai linfociti T naïve. La disseminazione dei linfociti B nell'organismo favorisce il riconoscimento degli antigeni microbici presenti in luoghi diversi e la risposta a essi. I linfociti B immaturi lasciano il midollo attraverso il circolo ematico, entrano nella polpa rossa della milza e migrano nelle zone periferiche della polpa bianca. Maturando ulteriormente, i linfociti B esprimono il recettore CXCR5, che ne promuove la migrazione nella polpa bianca in risposta alla chemochina CXCL13. Una volta che la maturazione nella polpa bianca è stata completata, i linfociti B naïve follicolari rientrano in circolo e si localizzano nei linfonodi e nei tessuti linfoidi associati alle mucose. Questo processo richiede l'espressione da parte dei linfociti B naïve dei recettori CXCR4 e CCR7 e dei rispettivi ligandi CXCL12 e CCL19/CCL21. La migrazione dei linfociti B naïve dal sangue ai linfonodi necessita di interazioni particolari con le HEV, cioè l'adesione e il rolling, l'attivazione delle integrine da parte delle chemochine espresse sulle HEV e l'arresto saldo, come già descritto per i linfociti T naïve. La migrazione dei linfociti B naïve nei follicoli è guidata da una chemochina, CXCL13, che

lega CXCR5 sui linfociti B ed è prodotta nei follicoli da cellule stromali di origine non ematopoietica chiamate cellule dendritiche follicolari. CXCL13 è espresso dalle cellule reticolari fibroblastiche nelle aree T e dalle cellule dendritiche follicolari nei follicoli; questa espressione serve a guidare il movimento direzionale dei linfociti B. L'homing dei linfociti B naïve nelle placche di Peyer necessita invece di CXCR5 e dell'integrina $\alpha_4\beta_7$, che lega MadCAM-1. Nel corso della risposta agli antigeni proteici, i linfociti B devono interagire direttamente con le cellule T_H; per questo processo è necessario che la localizzazione dei linfociti B e T negli organi linfoidi secondari sia molto ben controllata. Nel Capitolo 11 verranno discussi più in dettaglio le chemochine e i meccanismi coinvolti.

La fuoriuscita dei linfociti B dagli organi linfoidi secondari è controllata da S1P. Questo processo è stato descritto per le plasmacellule secernenti anticorpi che fuoriescono dai linfonodi e dalla milza in cui si sono attivati in seguito al riconoscimento dell'antigene e devono ora migrare al midollo osseo o nei tessuti. Nella milza, i linfociti B follicolari migrano nella zona marginale e sono trasportati dai fluidi nella polpa rossa e quindi in circolo. I linfociti B follicolari con deficit di S1PR1 possiedono una ridotta capacità di abbandonare la milza. Presumibilmente, i linfociti B follicolari naïve che entrano negli organi linfoidi secondari ma non vengono attivati dall'antigene rientrano in circolo in modo simile a quanto accade ai linfociti T naïve, ma non è chiaro in che modo questo processo sia controllato. Nei roditori, i linfociti B della zona marginale fanno la spola tra la zona marginale e i follicoli senza entrare in circolo. Nell'uomo, le stesse cellule invece ricircolano e sono inoltre presenti attorno ai follicoli linfonodali.

Sottopopolazioni di linfociti B che esprimono tipi specifici di anticorpi sono indirizzate in tessuti specifici. Come vedremo in seguito, popolazioni diverse di linfociti B attivati sono in grado di secernere differenti tipi di anticorpi, chiamati *isotipi*, ognuno dei quali ha funzioni effettrici diverse. Molte plasmacellule migrano nel midollo osseo, dove secernono anticorpi per lunghi periodi. La maggior parte di queste produce IgG, che si distribuiranno attraverso il circolo ematico in tutto l'organismo. I linfociti B presenti nei tessuti linfoidi associati alle mucose sono generalmente in grado di produrre IgA e sono state indirizzati specificamente a localizzarsi nei tessuti epiteliali mucosali. L'homing selettivo di questi linfociti e la loro differenziazione in plasmacellule che secernono IgA a livello delle regioni

mucosali rendono ottimale la risposta immunitaria contro le infezioni oltre a offrire una protezione basale a livello delle barriere mucosali. Infatti, come vedremo nel Capitolo 14, le IgA possono essere secrete efficacemente nel lume dei tessuti mucosali epiteliali, come l'intestino e l'albero respiratorio. I meccanismi che regolano la migrazione selettiva delle diverse sottopopolazioni di linfociti B nei diversi tessuti sono simili a quelli descritti per le cellule T effettrici e dipendono dall'espressione coordinata di particolari molecole di adesione e di recettori per le chemochine. Per esempio, le plasmacellule secernenti IgG che si localizzano nel midollo osseo esprimono VLA-4 e CXCR4, molecole che vengono riconosciute, rispettivamente, da VCAM-1 e CXCL12 espressi dalle cellule endoteliali dei sinusoidi del midollo. Per contro, le plasmacellule secernenti IgA che si localizzano nelle mucose esprimono $\alpha_4\beta_7$, CCR9 e CCR10, che riconoscono rispettivamente MadCAM-1, CCL25 e CCL28, espresse dalle cellule degli endoteli mucosali. I linfociti B che secernono IgG sono reclutati anche nei siti di infiammazione cronica presenti in vari tessuti e questo tipo di homing può essere attribuito all'espressione di VLA-4 e CXCR3, che sono i ligandi di VCAM-1 e di CXCL9 e CXCL10, molecole espresse sulla superficie endoteliale nei siti di infiammazione cronica.

RIEPILOGO

* La migrazione dei leucociti dal sangue ai tessuti avviene a livello delle venule postcapillari e dipende dall'azione delle molecole di adesione presenti sui leucociti e sulle cellule endoteliali vascolari e delle chemochine.
* Le selectine sono molecole di adesione che legano i carboidrati e che sono responsabili dell'interazione a bassa affinità tra i leucociti e le cellule endoteliali che avvengono nelle prime fasi della migrazione leucocitaria dal sangue ai tessuti. La E- e la P-selectina sono espresse dalle cellule endoteliali attivate dalle citochine e legano molecole espresse dai leucociti. La L-selectina è espressa dai leucociti e lega molecole espresse dalle cellule endoteliali.
* Le integrine costituiscono una ampia famiglia di molecole di adesione; alcune di queste sono responsabili dell'adesione dei leucociti all'endotelio attivato, un processo critico nel reclutamento dal sangue ai tessuti. Le principali integrine leucocitarie sono LFA-1 e VLA-4, che legano rispettivamente sulle cellule endoteliali ICAM-1 e VCAM-1. Le chemochine e altri segnali presenti nei siti di infezione aumentano l'affinità delle integrine leucocitarie, mentre varie citochine (TNF, IL-1) aumentano l'espressione dei ligandi delle integrine sulle cellule endoteliali.
* La migrazione dei leucociti dal sangue ai tessuti consiste in interazioni sequenziali con le cellule endoteliali che iniziano con il rolling dei leucociti dovuto all'interazione delle selectine con i rispettivi ligandi. Successivamente, i leucociti si legano saldamente sulla

superficie dell’endotelio attraverso l’azione delle integrine; i ligandi delle integrine sono espressi dalle cellule endoteliali e appartengono alla superfamiglia delle Ig.

* Il ricircolo linfocitario è il processo in base al quale i linfociti naïve migrano di continuo dal sangue agli organi linfoidi secondari attraverso le HEV, tornano nel sangue attraverso il circolo linfatico per ritornare in altri organi linfoidi secondari. Questo processo massimizza la probabilità che i linfociti T naïve incontrino l’antigene ed è fondamentale ai fini dell’avvio delle risposte immunitarie.
* I linfociti B e T naïve migrano preferenzialmente nei linfonodi; questo processo è mediato dal legame delle L-selectine, espresse dai linfociti, con le addressine espresse dalle HEV dei linfonodi periferici e CCR7, espresso dai linfociti, che lega le chemochine CCL19 e CCL21 prodotte nei linfonodi.
* Le cellule effettrici e della memoria che si generano in seguito alla stimolazione dei linfociti T naïve da parte di un antigene escono dal linfonodo mediante un processo che dipende dal recettore per la sfingosina-1 fosfato, espresso dai linfociti, e da un gradiente di S1P. I linfociti effettori mostrano una diminuita espressione di L-selectina e di CCR7 e un aumento dell’espressione delle integrine e dei ligandi per le E- e le P-selectine, responsabili del legame con l’endotelio presente nei focolai periferici di infiammazione. I linfociti effettori e della memoria esprimono anche recettori per le chemochine prodotte nei tessuti periferici infettati.

LETTURE CONSIGLIATE

Molecole di adesione

Hogg N.; Patzak I.; Willenbrock F: The insider’s guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nature Reviews Immunology* 11:416–426 (2011).

Kolaczkowska E.; Kubes P: Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 13:159–175 (2013).

Ley K.; Laudanna C.; Cybulsky M.I.; Nourshargh S: Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology* 7:678–689 (2007).

Muller W.A: Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. *Annual Review of Pathology* 6:323–344 (2011).

Chemochine

Griffith J.W.; Sokol C.L.; Luster A.D: Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual Review of Immunology* 32:659–702 (2014).

Sallusto F.; Baggiolini M: Chemokines and leukocyte traffic. *Nature Immunology* 9:949–952 (2008).

Zlotnik A.; Yoshie O: The chemokine superfamily revisited. *Immunity* 36:705–716 (2012).

Migrazione dei linfociti attraverso i tessuti linfoidi

Bajénoff M.; Egen J.G.; Qi H.; Huang A.Y.; Castellino F.; Germain R.N: Highways, byways and breadcrumbs: directing lymphocyte traffic in the lymph node. *Trends in Immunology* 28:346–352 (2007).

Cyster J.G.; Schwab S.R: Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annual Review of Immunology* 30:69–94 (2012).

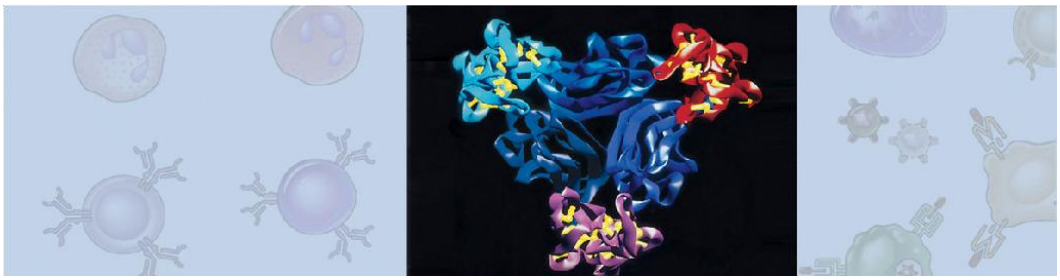
Masopust D.; Schenkel J.M: The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nature Reviews Immunology* 13:309–320 (2013).

Sigmundsdottir H.; Butcher E.C: Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking. *Nature Immunology* 9:981–987 (2008).

Weninger W.; Biro M.; Jain R: Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. *Nature Reviews Immunology* 14 (2014). in press.

CAPITOLO

4



Immunità innata

IMMUNITÀ INNATA: CARATTERISTICHE GENERALI
- Scopo e strategie delle risposte immunitarie innate
- Immunità innata e adattativa a confronto
- Evoluzione dell'immunità innata

COME L'IMMUNITÀ INNATA RICONOSCE I MICROBI E IL SELF DANNEGGIATO

RECETTORI DELL'IMMUNITÀ INNATA
- Recettori Toll-like
- Recettori citosolici per i PAMP e i DAMP
- Altri recettori cellulari

CELLULE DELL'IMMUNITÀ INNATA
- Barriere epiteliali
- Cellule fagocitiche
- Cellule dendritiche
- Cellule natural killer e altre cellule linfoidi innate
- Linfociti T e B dotati di recettori poco diversificati
- Mastociti

MOLECOLE SOLUBILI DI RICONOSCIMENTO ED EFFETTRICI DELL'IMMUNITÀ INNATA
- Sistema del complemento
- Pentrassine
- Collectine e ficoline

RISPOSTA INFIAMMATORIA
- Principali citochine proinfiammatorie: TNF, IL-1 e IL-6
- Reclutamento dei leucociti nei focolai infettivi
- Ingestione e uccisione dei microbi da parte delle cellule fagocitiche attivate
- Effetti sistemici e patologici dell'infiammazione

RISPOSTA ANTIVIRALE

ATTIVAZIONE DELL'IMMUNITÀ ADATTATIVA

MECCANISMI INIBITORI CHE REGOLANO LE RISPOSTE IMMUNITARIE INNATE

RIEPILOGO

IMMUNITÀ INNATA: CARATTERISTICHE GENERALI

Il sistema immunitario innato, di cui è stata fornita una breve introduzione nel Capitolo 1, consiste di svariati tipi cellulari e molecole solubili presenti nei tessuti e nel sangue, che prevengono l'invasione e l'instaurazione di infezioni da parte dei microbi. La risposta immunitaria innata offre una barriera difensiva precoce, prima che si possano sviluppare risposte immunitarie adattative (vedi Fig. 1-1).In questo capitolo, descriveremo in maggior dettaglio i componenti, la specificità e i meccanismi antimicrobici del sistema

immunitario innato. Anche se il tema di questo volume è incentrato sul ruolo della risposta immunitaria adattativa nella difesa dell'ospite e nella malattia, tratteremo l'impatto del sistema immunitario innato sulle risposte immunitarie adattative e il modo in cui il sistema immunitario innato contribuisce alla protezione dalle infezioni.

Scopo e strategie delle risposte immunitarie innate

L'immunità innata assolve a tre funzioni essenziali che ci proteggono dai microbi e dalle lesioni tissutali.

- ***L'immunità innata è la risposta iniziale nei confronti di microrganismi patogeni e previene, controlla o elimina le infezioni.*** L'importanza dell'immunità innata nella difesa dell'ospite si evince dalle osservazioni cliniche e dagli studi sperimentali, dai quale emerge che i deficit, l'inibizione o l'eliminazione di uno dei numerosi meccanismi dell'immunità innata determina un sensibile incremento della suscettibilità alle infezioni, anche quando il sistema immunitario adattativo è intatto e funzionale. Diversi microbi hanno sviluppato strategie volte a resistere all'immunità innata, che sono fondamentali per la loro virulenza. Le risposte immunitarie innate nei confronti di microrganismi patogeni possono tenere sotto controllo l'infezione fino all'attivazione di risposte immunitarie adattative spesso più potenti e specializzate, che sono in grado di eliminare i microbi che resistono alle difese dell'immunità innata.
- ***L'immunitàinnata elimina le cellule danneggiate e avvia il processo di riparazione tissutale.*** Tali meccanismi riconoscono e rispondono alle molecole che sono prodotte, rilasciate o accumulate in cellule alterate, danneggiate o uccise. L'evento che scatena queste risposte può derivare da un danno cellulare e tissutale causato sia da processi infettivi sia non infettivi.
- ***L'immunità innata stimola e influenza la natura delle risposte adattative al fine di ottimizzarne l'efficacia contro diversi tipi di microbi.*** Pertanto, l'immunità innata non solo assolve a funzioni difensive nei confronti dell'infezione, ma invia anche segnali di pericolo che mettono il sistema immunitario adattativo in allerta. Inoltre, diversi componenti della risposta immunitaria innata possono reagire in modi diversi a microbi diversi (per esempio batteri *vs* virus), influenzando il tipo di risposta adattativa che si sviluppa. Torneremo su questo concetto alla fine del capitolo.

I due principali tipi di risposta dell'immunità innata responsabili della protezione nei confronti dei microbi sono l'infiammazione e la difesa antivirale. L'infiammazione è il processo attraverso il quale i leucociti in circolo e le proteine plasmatiche si accumulano nei siti di infezione tissutale dove vengono attivati per uccidere ed eliminare i patogeni. La risposta infiammatoria costituisce anche la principale reazione che si instaura in presenza di cellule danneggiate o morte e nei casi di accumulo di sostanze anomale nelle cellule e nei tessuti. La difesa antivirale consiste nei cambiamenti cellulari atti a prevenire la

replicazione virale e ad aumentare la suscettibilità delle cellule infettate all'uccisione da parte dei linfociti, eliminando in tal modo i siti di replicazione virale.

Oltre all'infiammazione e alle risposte antivirali, l'immunità innata comprende meccanismi di difesa fisica e chimica operati dalle barriere epiteliali come la cute e la mucosa dei tratti gastrointestinale e respiratorio, la cui funzione è bloccare ogni tentativo di ingresso da parte dei microbi. Inoltre, l'immunità innata si basa sull'azione di numerose cellule (per esempio i neutrofili) e proteine circolanti (per esempio il sistema del complemento) che contribuiscono all'eliminazione dei microbi presenti nel sangue.

Immunità innata e adattativa a confronto

Al fine di comprendere in che modo l'immunità innata e adattativa si complementano vicendevolmente nella protezione nei confronti dei patogeni, è importante sottolinearne le principali differenze.

- Le risposte immunitarie innate nei confronti di un microbo sono immediate e non richiedono una pregressa esposizione al microbo stesso. In altri termini, le cellule e le molecole effettrici dell'immunità innata sono già perfettamente funzionali prima dell'infezione o vengono attivate in breve tempo in modo da prevenire, controllare o eliminare le infezioni. Viceversa, le risposte immunitarie adattative si sviluppano nell'arco di diversi giorni dall'infezione, quando cloni di linfociti si espandono e si differenziano in cellule effettrici.
- Non si osservano variazioni apprezzabili nella qualità o nell'entità delle risposte innate in caso di esposizione ripetuta a un microbo; in altri termini la memoria è scarsa o assente. Al contrario, l'esposizione ripetuta a un microbo migliora la rapidità, l'entità e l'efficacia dell'immunità adattativa.
- La risposta immunitaria innata è attivata dal riconoscimento di un numero relativamente limitato di strutture prodotte dai microbi o espresse dalle cellule danneggiate o morte. Si stima che l'immunità innata riconosca circa 1.000 molecole microbiche o prodotte dalle cellule danneggiate. Viceversa, l'immunità adattativa è in grado di riconoscere milioni di diverse strutture molecolari microbiche, antigeni ambientali non microbici e antigeni self che sono normalmente presenti nei tessuti sani. I recettori responsabili delle diverse specificità del sistema immunitario innato e adattativo sono descritti più avanti in questo capitolo e in quelli successivi.

Evoluzione dell'immunità innata

L'immunità innata costituisce la prima linea di difesa contro le infezioni e rappresenta la componente del sistema immunitario più antica dal punto di vista filogenetico. Essa si è evoluta insieme ai patogeni con lo scopo di proteggere gli organismi pluricellulari dalle infezioni. La notevole somiglianza di alcune componenti dell'immunità innata di piante, insetti e mammiferi indica che essa è comparsa in un antenato comune molto lontano nella scala evolutiva. Per esempio, le defensine, peptidi tossici per batteri e funghi, si ritrovano

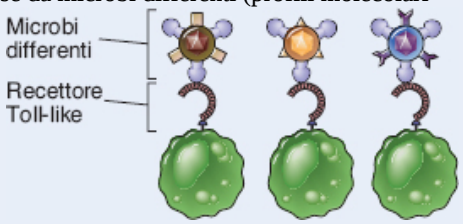
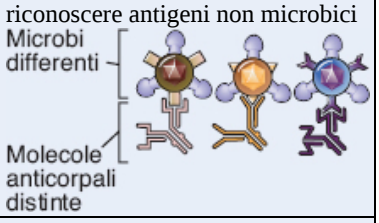
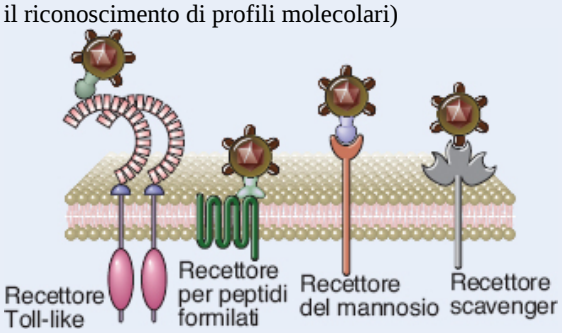
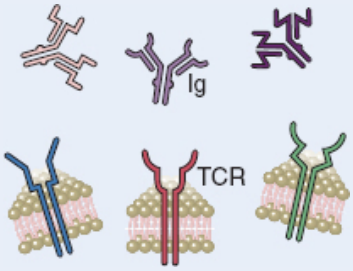
nelle piante e nei mammiferi, dove mostrano essenzialmente la stessa struttura terziaria. Una famiglia di recettori, che tratteremo in dettaglio più avanti in questo capitolo, conosciuti con il nome di recettori Toll-like, sono in grado di riconoscere i microbi e di attivare i meccanismi di difesa antimicrobica. Questi recettori si ritrovano in ogni singola forma di vita, dagli insetti ai mammiferi. Anche il principale meccanismo di trasduzione del segnale da essi innescato per attivare la cellula, chiamato nei mammiferi cascata di NF-κB, mostra un alto livello di conservazione filogenetica. In sostanza, la maggior parte dei meccanismi di difesa utilizzati dall'immunità innata sono comparsi nella scala evolutiva subito dopo lo sviluppo degli organismi pluricellulari complessi, circa 750 milioni di anni fa. Al contrario, è possibile identificare con certezza l'immunità adattativa solamente nei vertebrati, che sono comparsi circa 350-500 milioni di anni fa.

Nei paragrafi che seguono descriveremo dapprima i meccanismi con cui l'immunità innata riconosce i microbi e le cellule danneggiate; in seguito, esamineremo i singoli componenti dell'immunità innata e le loro funzioni nell'ambito dei meccanismi di difesa.

COME L'IMMUNITÀ INNATA RICONOSCE I MICROBIE IL SELF DANNEGGIATO

I sistemi dell'immunità innata per il riconoscimento dei patogeni differiscono sostanzialmente da quelli dell'immunità adattativa per diversi aspetti (Tab. 4-1).

TABELLA 4-1 Specificità dell'immunità innata e specifica

	Immunità innata	Immunità specifica
Specificità	Per strutture condivise da microbi differenti (profili molecolari associati a patogeni) 	Per elementi strutturali di molecole microbiche (antigeni); può riconoscere antigeni non microbici 
Recettori	Codificati nella linea germinativa; diversità limitata (recettori per il riconoscimento di profili molecolari) 	Codificati da geni prodotti per ricombinazione somatica; maggiore diversificazione 
Distribuzione	Non clonale: recettori identici su tutte le cellule della stessa linea	Clonale: cloni di linfociti con

dei recettori		specificità distinte esprimono recettori differenti
Discriminazione tra self e non self	Sì; le cellule normali dell'ospite non sono riconosciute o possono esprimere molecole che prevengono le reazioni dell'immunità innata	Sì; basata sull'eliminazione o sull'inattivazione dei linfociti che reagiscono contro il self

L'immunità innata riconosce strutture molecolari che sono prodotte dai patogeni. Tali strutture sono spesso condivise da diverse classi di microbi e sono chiamate **profili molecolari associati ai patogeni (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMP)**. Classi diverse di microbi, quali per esempio virus, batteri Gram-negativi, batteri Gram-positivi e funghi, esprimono PAMP differenti. Esempi di PAMP sono gli acidi nucleici caratteristici dei microrganismi quali l'RNA a doppia catena, di origine virale, e il DNA ricco di sequenze CpG non metilate, che si riscontra nei batteri; proteine microbiche che per esempio iniziano con una *N*-formilmetionina, tipica dei batteri; lipidi e carboidrati complessi sintetizzati dai microrganismi, ma non da cellule di mammifero, come i lipopolisaccaridi (LPS) nei batteri Gram-negativi, gli acidi lipoteicoici nei batteri Gram-positivi e gli oligosaccaridi con residui terminali di mannosio, che caratterizzano le glicoproteine microbiche (Tab. 4-2). Mentre l'immunità innata si è evoluta per riconoscere un numero limitato di molecole, specifiche dei microrganismi patogeni, l'immunità adattativa riconosce un numero decisamente più elevato di molecole che possono essere sia di origine microbica sia non microbica.

TABELLA 4-2 Esempi di PAMP e DAMP

Profili molecolari associati ai patogeni		**Tipo di microbo**
Acidi nucleici	ssRNA	Virus
	dsRNA	Virus
	CpG	Virus, batteri
Proteine	Pilina	Batteri
	Flagellina	Batteri
Lipidi della parete cellulare	LPS	Batteri Gram-negativi
	Acido lipoteicoico	Batteri Gram-positivi
Carboidrati	Mannano	Funghi, batteri
	Glucani	Funghi
Profili molecolari associati al danno cellulare		
Proteine indotte da stress cellulare	HSP	
Cristalli	Urato monosodico	
Proteine nucleari	HMGB1	

CpG, *cytosine-guanine-rich oligonucleotide*; dsRNA, *double-stranded RNA*; HMGB1, *High-Mobility Group Box 1*; HSP, *Heat Shock Protein*; LPS, *lipopolisaccaride*; ssRNA, *single-stranded RNA.*

L'immunità innata riconosce prodotti microbici che sono spesso indispensabili per la sopravvivenza dei microrganismi. Ciò è importante perché garantisce che tali molecole, bersaglio dell'immunità innata, non possano essere modificate dai microbi nel tentativo di sfuggire al riconoscimento da parte dell'ospite. Per esempio, l'RNA virale a doppia elica è un intermediario essenziale nel ciclo replicativo di numerosi virus, mentre l'LPS e l'acido lipoteicoico sono componenti strutturali delle pareti batteriche e sono dunque necessari per la loro sopravvivenza. Al contrario, come vedremo nel Capitolo 16, i microbi possono mutare o perdere molti degli antigeni riconosciuti dall'immunità adattativa, riuscendo in questo modo a eludere le difese dell'ospite senza compromettere la propria sopravvivenza.

L'immunità innata è anche in grado di riconoscere molecole endogene prodotte o rilasciate dalle cellule danneggiate o morte. Queste sostanze sono chiamate **profili molecolari associati al danno (*Damage-Associated Molecular Patterns*, DAMP)** (vedi Tab. 4-2). I DAMP possono essere il risultato di un danno cellulare di origine infettiva o non infettiva, per esempio di natura ambientale (tossine chimiche, ustioni, traumi) o ischemico. Le cellule apoptotiche, generalmente, non rilasciano DAMP. In alcuni casi, le cellule sane del sistema immunitario vengono stimolate a produrre certi DAMP, definiti allarmine, con lo scopo di potenziare la risposta innata alle infezioni.

L'immunità innata riconosce i PAMP e i DAMP utilizzando sia recettori cellulari, distribuiti in diversi compartimenti cellulari, sia molecole solubili presenti nel sangue e nelle secrezioni mucose (Tab. 4-3). I recettori cellulari sono espressi da fagociti (principalmente macrofagi e neutrofili), cellule dendritiche, cellule epiteliali (che formano le barriere poste all'interfaccia tra organismo e ambiente) e molti altri tipi cellulari e sono noti come recettori che riconoscono i **profili molecolari (*Pattern Recognition Receptors*, PRR)**: essi sono espressi sulla membrana plasmatica, nelle vescicole fagocitiche e nel citosol (Fig. 4-1). Quando i PRR cellulari legano i PAMP o i DAMP attivano vie di trasduzione del segnale che promuovono le funzioni antimicrobiche e proinfiammatorie della cellula. Oltre a questi PRR cellulari esistono molte proteine solubili, presenti nel sangue e nei fluidi extracellulari, in grado di riconoscere i PAMP (vedi Tab. 4-3). Esse hanno il compito di facilitare l'eliminazione dei microbi attraverso la fagocitosi e l'attivazione di meccanismi microbicidi.

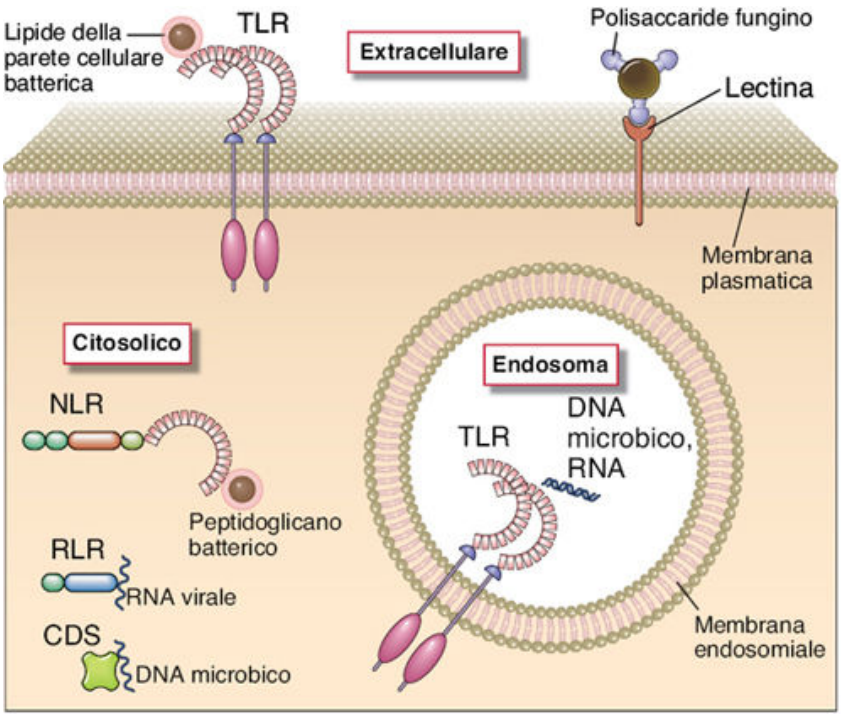


FIGURA 4-1 Localizzazione cellulare dei recettori dei PRR dell'immunità innata. Alcuni PRR, quali i membri della famiglia dei TLR (vedi Fig. 4-2) e i recettori lectinici, sono espressi sulla membrana cellulare, dove legano i PAMP extracellulari. Altri TLR sono espressi all'interno della cellula, sulle membrane degli endosomi, e riconoscono gli acidi nucleici dei microbi che sono stati fagocitati. Esistono altri sensori citosolici di infezione microbica, come i recettori di tipo NOD (NLR), i recettori di tipo RIG (RLR) e sensori di DNA citosolico (CDS). Vengono illustrati a scopo semplificativo soltanto alcuni dei PAMP microbici riconosciuti da questi recettori. I recettori citosolici che riconoscono i prodotti di cellule danneggiate (DAMP) e alcuni microbi sono mostrati nella Figura 4-4.

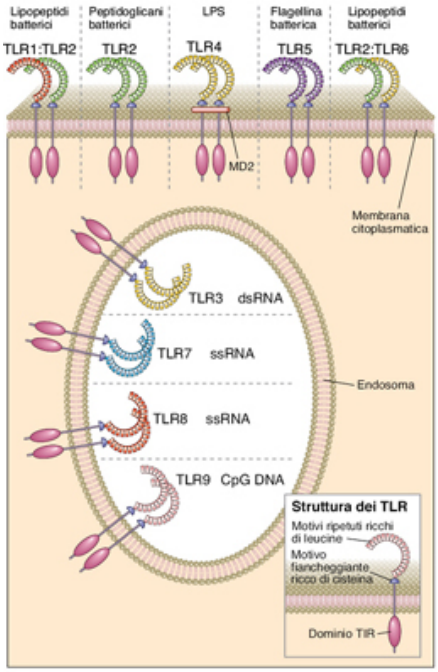


FIGURA 4-2 Struttura, localizzazione e specificità dei TLR dei mammiferi. Si noti che alcuni TLR sono espressi sulla superficie cellulare e altri negli endosomi. I TLR possono formare omodimeri o eterodimeri.

I recettori dell'immunità innata sono codificati da geni ereditari (linea germinale), mentre i recettori dell'immunità adattativa sono generati dalla ricombinazione somatica di segmenti genici durante la maturazione dei precursori dei linfociti. Di conseguenza, la diversità dei recettori e il grado di specificità del sistema immunitario innato sono limitati rispetto a quelli del sistema immunitario adattativo. Inoltre, mentre l'immunità specifica può distinguere tra antigeni espressi da microbi diversi appartenenti alla stessa classe e persino tra antigeni differenti di uno stesso microrganismo, l'immunità innata può distinguere solo le diverse classi di microrganismi o le cellule danneggiate rispetto alle sane, ma non la specie microbica o il tipo cellulare.

L'immunità innata non reagisce contro cellule e tessuti normali non danneggiati. Questa caratteristica è, ovviamente, essenziale per il mantenimento dell'integrità dell'organismo. Il mancato riconoscimento del self è dovuto a tre principali meccanismi: 1) le cellule normali non producono ligandi per i recettori dell'immunità innata, 2) tali recettori si trovano in compartimenti cellulari che non vengono a contatto con le molecole dell'ospite e 3) le cellule normali possiedono proteine che impediscono l'attivazione delle diverse componenti dell'immunità innata. Discuteremo alcuni esempi di tale tipo di regolazione più avanti in questo capitolo.

Procederemo ora alla descrizione della grande varietà di molecole, che riconoscono i PAMP e i DAMP, focalizzandoci sulla loro specificità, localizzazione e funzione. Inizieremo presentando le molecole associate alle cellule, sia di membrana sia citosoliche, mentre le molecole solubili dell'immunità innata, presenti nel sangue e nei fluidi extracellulari, verranno descritte successivamente.

RECETTORI DELL'IMMUNITÀ INNATA

Quasi tutte le cellule esprimono PRR e possono dunque partecipare alla risposta immunitaria innata. Tuttavia le cellule che presentano la maggiori varietà e quantità di PRR sono i fagociti (neutrofili e macrofagi) e le cellule dendritiche. Questo aspetto è coerente con la funzione dei fagociti di riconoscimento della presenza di microbi e cellule danneggiate e di ingestione degli stessi ai fini della loro eliminazione, nonché del ruolo delle cellule dendritiche di attivare una successiva risposta immunitaria adattativa. I PRR attivano vie di trasduzione del segnale che determinano risposte cellulari quali la produzione di molecole proinfiammatorie e antimicrobiche.

Di seguito descriveremo i differenti PRR suddivisi per classi strutturali e funzionali.

Recettori Toll-like

I recettori Toll-like rappresentano un'importante famiglia di PRR espressi da molti tipi cellulari. Essi si sono conservati filogeneticamente e sono in grado di riconoscere i

prodotti di una grande varietà di microbi e molecole espresse o rilasciate da cellule danneggiate e morte. Il gene *Toll* venne originariamente identificato nel corso di studi embriogenetici nella *Drosophila* come elemento importante per la polarizzazione dorsoventrale. Successivamente si scoprì che la proteina Toll era anche responsabile di risposte antimicrobiche. Inoltre, si osservò che il dominio citoplasmatico delle proteine Toll era simile alla regione citoplasmatica del recettore per una citochina pro-infiammatoria, l'interleuchina-1 (IL-1). Questa scoperta spinse a ricercare e identificare nei mammiferi i geni omologhi di Toll, che furono chiamati *recettori simili a Toll* (*Toll-like Receptors*, TLR). Nell'uomo esistono nove diversi TLR funzionanti, denominati TLR1-TLR9 (Fig. 4-2).

I TLR sono glicoproteine integrali di membrana contenenti, nella regione extracellulare, ripetizioni di residui ricchi in leucina fiancheggiati da caratteristici motivi ricchi in cisteina responsabili del riconoscimento del ligando. Le loro code citoplasmatiche contengono un dominio di omologia denominato TIR (*Toll-IL-1 Receptor*), essenziale per l'attivazione cellulare. Il dominio TIR si ritrova anche nelle code citoplasmatiche dei recettori di IL-1 e IL-18, due citochine che attivano una cascata di trasduzione del segnale simile a quella dei TLR.

Nei mammiferi i TLR sono responsabili della risposta a un'ampia varietà di molecole espresse dalle cellule microbiche ma non dalle cellule normali. I ligandi riconosciuti dai differenti TLR sono strutturalmente diversi e includono prodotti di tutte le classi di microrganismi (vedi Fig. 4-2). Esempi di prodotti batterici che legano i TLR sono l'LPS e l'acido lipoteicoico, costituenti rispettivamente delle pareti cellulari dei batteri Gram-negativi e Gram-positivi, e la flagellina, subunità proteica che compone il flagello dei batteri mobili. Esempi di acidi nucleici che sono ligandi dei TLR sono: 1) l'RNA a doppia elica, che costituisce il genoma di alcuni virus e viene generato durante il ciclo vitale della maggior parte dei virus a RNA, ma non è prodotto dalle cellule eucariote, e gli RNA a singola elica: questi RNA vengono discriminati dall'RNA dell'ospite grazie alla loro localizzazione endosomiale e al loro alto contenuto di guanosina e uridina e 2) nucleotidi CpG non metilati, che sono comuni nei procarioti ma rari nel genoma dei vertebrati.

***I TLR sono anche coinvolti nella risposta a molecole endogene la cui espressione o localizzazione indica la presenza di un danno cellulare*.** Tra gli esempi di molecole self che legano i TLR vi sono le proteine da shock (*Heat-Shock Protein*, HSP) indotte in risposta a segnali di stress cellulare e l'HMGB-1 (*High-Mobility Group Box 1*), una proteina abbondantemente espressa che lega il DNA ed è coinvolta nella trascrizione e nella riparazione del genoma. Entrambe queste proteine sono normalmente intracellulari ma possono essere rilasciate dalle cellule danneggiate o morte. Una volta rilasciate nell'ambiente extracellulare, esse legano e attivano TLR2 e TLR4 espressi da cellule dendritiche, macrofagi e altri tipi cellulari.

***La base strutturale della specificità dei TLR risiede nei moduli extracellulari ripetuti ricchi di residui di leucina che legano i PAMP direttamente o attraverso molecole adattatrici*.** Nei TLR sono presenti 16-28 moduli ricchi di residui di leucina, ciascuno composto da 20-30 aminoacidi organizzati in motivi conservati LxxLxLxxN (dove L

significa leucina, x un aminoacido qualunque ed N è un'asparagina) e residui aminoacidici variabili. I residui variabili, responsabili del legame del profilo microbico, si trovano sulla superficie convessa del recettore (vedi più avanti Fig. 4-3). Queste sequenze ripetute sono importanti per permettere ad alcuni TLR di legare molecole idrofobiche come l'LPS batterico. Il legame del microbo ai domini ricchi di leucina causa l'interazione fisica e la dimerizzazione dei TLR. I TLR possono anche eterodimerizzare, ampliando così ulteriormente la gamma delle specificità per i PAMP. Per esempio, per la risposta ai peptidoglicani sono necessari dimeri di TLR2 e TLR6.

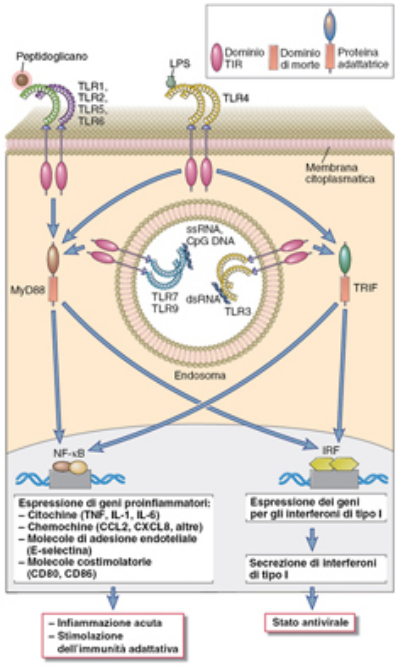


FIGURA 4-3 Vie di trasduzione del segnale e funzioni dei TLR. I TLR 1, 2, 5 e 6 utilizzano la proteina adattatrice MyD88 e attivano i fattori trascrizionali NF-κB e AP-1. Il TLR3 utilizza l'adattatore TRIF e attiva i fattori trascrizionali IRF3 e IRF7. Il TLR4 può attivare entrambe le vie. TLR 7 e TLR 9 utilizzano MyD88 all'interno dell'endosoma e attivano sia NF-κB sia IRF7.

Le specificità dei TLR sono influenzate anche da molecole accessorie, come avviene per esempio per il riconoscimento dell'LPS da parte di TLR4. Infatti, l'LPS si lega dapprima a una proteina solubile presente nel sangue e nei fluidi extracellulari, detta LBP (*LPS Binding Protein*), che ne facilita il trasporto alla superficie della cellula deputata al suo riconoscimento. Un'ulteriore proteina extracellulare chiamata MD2 (*Myeloid Differentiation Protein* 2) lega l'LPS in corrispondenza di un suo componente detto lipide A, formando un complesso che poi interagisce con il TLR4 e inizia la cascata di trasduzione del segnale. Anche la proteina CD14 è necessaria affinché l'attivazione cellulare sia efficiente: CD14 è espressa da tutte le cellule, endoteli esclusi, come proteina solubile o di membrana ancorata mediante una coda di glicofosilfosfatidilinositolo. Sia CD14 sia MD2 possono associarsi anche ad altri TLR. Dunque, combinazioni diverse di

molecole accessorie permettono di ampliare ulteriormente la gamma di prodotti microbici in grado di attivare la risposta innata.

I TLR si trovano sia sulla superficie cellulare sia sulle membrane intracellulari e possono dunque riconoscere microbi localizzati in diversi compartimenti cellulari (Fig. 4-2). I TLR 1, 2, 4, 5 e 6 sono espressi sulla membrana citoplasmatica, dove riconoscono i PAMP presenti nell'ambiente extracellulare. Alcuni di questi PAMP sono tra i più potenti stimolatori della risposta immunitaria innata; basti citare l'LPS e l'acido lipoteico, riconosciuti rispettivamente da TLR4 e da TLR2. Al contrario, i TLR 3, 7, 8 e 9 sono intracellulari, essendo espressi prevalentemente nel reticolo endoplasmatico e sulle membrane endosomiali, dove riconoscono acidi nucleici che sono tipici dei microbi ma non dei mammiferi, come spiegato in precedenza (Fig. 4-2). Tra questi troviamo l'RNA a doppio filamento, che si lega al TLR3, e motivi CpG non metilati, che si legano al TLR9. TLR7 e TLR8 riconoscono l'RNA a singola elica e il TLR9 riconosce il DNA a singola o doppia elica; questi ligandi in realtà non sono esclusivi dei microbi, ma la loro localizzazione negli endosomi rispecchia verosimilmente l'origine microbica. Infatti, l'RNA e il DNA della cellula ospite non sono normalmente presenti negli endosomi, mentre quelli microbici vi si accumulano in seguito ai processi di fagocitosi da parte dei neutrofili, macrofagi o cellule dendritiche. Di conseguenza, i TLR endosomici possono discriminare tra gli acidi nucleici di cellule normali e quelli microbici, sulla base della loro localizzazione cellulare. Sia la corretta localizzazione negli endosomi, sia il corretto funzionamento dei TLR 3, 7, 8 e 9 necessitano di una proteina presente nel reticolo endoplasmatico detta UNC-93B. Il deficit genetico di UNC-93B determina suscettibilità ad alcune infezioni virali, in modo particolare all'encefalite dal virus dell'herpes simplex, a indicare l'importanza dei TLR endosomiali nelle difese innate contro i virus.

Quando i TLR riconoscono i propri ligandi innescano diverse cascate di trasduzione del segnale che portano all'attivazione di fattori trascrizionali, i quali inducono l'espressione di geni fondamentali per le risposte infiammatoria e antivirale (Fig. 4-3). Queste vie di trasduzione iniziano con la dimerizzazione ligando-dipendente dei TLR, causata dal legame con il PAMP sulla superficie cellulare, nel reticolo endoplasmatico o negli endosomi, che porta i due domini TIR in stretto contatto. A ciò segue il reclutamento di proteine adattatrici contenenti il dominio TIR, che facilitano il reclutamento e l'attivazione di diverse proteine chinasi, le quali a loro volta attivano diversi fattori trascrizionali. I principali fattori di trascrizione attivati dai TLR sono il fattore nucleare κB (*Nuclear Factor-κB*, NF-κB), la proteina di attivazione 1(*Activation Protein 1*, AP-1), il fattore di risposta dell'interferone 3 (*Interferon Response Factor 3*, IRF3) e IRF7. NF-κB e AP-1 sono responsabili della produzione della maggior parte delle molecole necessarie per la risposta infiammatoria, tra cui citochine proinfiammatorie (per esempio TNF e IL-1), chemochine (per esempio CCL2 e CXCL8) e molecole di adesione endoteliali (per esempio E-selectina) (discusse più avanti). IRF3 e IRF7 promuovono invece la produzione di interferoni di tipo I (IFN-α e IFN-β), importanti per le risposte antivirali.

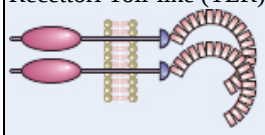
I diversi TLR utilizzano differenti combinazioni di adattatori e di trasduttori del segnale, il che rende ragione della specificità degli effetti attivati a valle. Per esempio, i

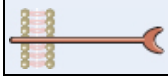
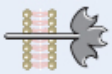
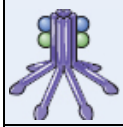
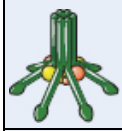
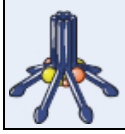
TLR di membrana che interagiscono con l'adattatore MyD88 determinano l'attivazione di NF-κB, mentre i TLR che utilizzano un adattatore chiamato TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β*) attivano IRF3. Tutti i TLR, eccezion fatta per il TLR3, utilizzano MyD88 e sono dunque capaci di attivare NF-κB e di indurre una risposta infiammatoria. Il TLR3 utilizza invece TRIF e dunque attiva IRF3 e induce l'espressione degli IFN di tipo I. Il TLR4 può attivare entrambe le vie e può quindi indurre entrambi i tipi di risposta. I TLR endosomiali 7 e 9, che sono espressi prevalentemente dalle cellule dendritiche plasmacitoidi (vedi Cap. 6), attivano una cascata MyD88-dipendente e TRIF-indipendente che attiva sia NF-κB sia IRF. Perciò il TLR7 e il TLR9, come il TLR4, inducono sia la risposta infiammatoria sia quella antivirale. I dettagli sull'attivazione di NF-κB verranno discussi nel Capitolo 7.

Recettori citosolici per i PAMP e i DAMP

Oltre ai TLR, che riconoscono i patogeni all'esterno della cellula o negli endosomi, le cellule dell'immunità innata esprimono i PRR e i loro ligandi a livello citosolico (vedi Fig. 4-1 e Tab. 4-3). Tre importanti classi di questi recettori sono: i recettori di tipo NOD, i recettori di tipo RIG e i sensori di DNA citosolici. Essi, analogamente ai TLR, attivano cascate di trasduzione che promuovono l'infiammazione o la produzione di IFN di tipo I. La possibilità di riconoscere nel citosol gli agenti infettivi è importante poiché qui si svolgono fasi cruciali del ciclo vitale di alcuni microbi, come per esempio la traduzione dei geni e l'assemblaggio delle particelle virali. Inoltre, alcuni patogeni riescono a sfuggire dalle vescicole fagocitiche, per esempio producendo tossine che creano pori nelle membrane intracellulari. Tali pori possono anche determinare cambiamenti nella concentrazione citosolica di molecole endogene, come ioni, cambiamenti che vengono riconosciuti dai recettori citosolici quali segni tangibili di infezione e danno.

TABELLA 4-3 Recettori per profili molecolari utilizzati dall'immunità innata

PRR (*Pattern Recognition Receptor*)	Localizzazione	Esempi specifici	PAMP/DAMP ligandi
Associati alla cellula			
Recettori Toll-like (TLR) 	Membrana plasmatica e membrane endosomiali di cellule dendritiche, fagociti, linfociti B, cellule endoteliali e molti altri tipi cellulari	TLR 1-9	Varie molecole microbiche, tra cui lipopolisaccaride e peptidoglicani batterici, acidi nucleici virali
Recettori NOD-like (NRL)	Citosol di fagociti, cellule epiteliali e altre cellule	NOD1/2	Peptidoglicani della parete batterica
		Famiglia NLRP (inflammasoma)	Cristalli intracellulari (urato, silica); modificazioni della concentrazione citosolica di ATP e di ioni, danno dei lisosomi

Recettori RIG-like (RLR)	Citosol dei fagociti e di altre cellule	RIG-1, MDA-5	RNA virale
Sensori citosolici di DNA (CDS)	Citosol di diversi tipi cellulari	AIM2; CDS associati a STING	DNA virale e batterico
Recettori simili alle lectine di tipo C (CLR) 	Membrane plasmatiche dei fagociti	Recettore del mannosio	Carboidrati di membrana dotati di residui di mannosio e di fruttosio
		Dectine	Glucani presenti sulle pareti dei funghi
Recettori scavenger 	Membrana plasmatica dei fagociti	CD36	Diacilgliceridi microbici
Recettori per *N*-formil met-leu-phe	Membrana plasmatica dei fagociti	FPR e FPRL1	Peptidi contenenti residui *N*-formilati
Solubili			
Pentrassine	Plasma	Proteina C reattiva	Fosforilcolina e fosfatidiletanolamina microbiche
Collectine 	Plasma	Lectina legante il mannosio	Carboidrati con residui di mannosio e fruttosio
	Alveoli	Proteine del surfattante SP-A e SP-D	Varie strutture microbiche
Ficoline 	Plasma	Ficolina	*N*-acetilglucosamina e acido lipoteicoico, componenti della parete cellulare dei batteri Gram-positivi
Complemento 	Plasma	Proteine del sistema del complemento	Superfici microbiche

Recettori di tipo NOD

I recettori di tipo NOD costituiscono una famiglia che comprende più di 20 proteine citosoliche, alcune delle quali riconoscono i PAMP e i DAMP citoplasmatici e assemblano complessi di trasduzione del segnale che promuovono l'infiammazione. L'acronimo NOD, scelto per indicare questa famiglia, sta a indicare proteine che contengono un dominio di oligomerizzazione nucleotidica (*Nucleotide Oligomerization Domain-Containing Protein*). Un tipico recettore NOD (*NOD-Like Receptor*, NLR) è composto per lo meno da tre diversi domini con struttura e funzioni caratteristiche. Uno di questi, analogamente ai TLR, contiene residui ripetuti di leucina ed è coinvolto nel riconoscimento del ligando; un secondo dominio detto NACHT (*Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein* [NAIP], CIITA, HET-E e TP1) è responsabile dell'oligomerizzazione; infine vi è un dominio effettore che recluta altre proteine per formare complessi di trasduzione del segnale e che può essere di tre tipi detti CARD (*CAspase Recruitment Domain*), dominio pirina e dominio BIR. A seconda del tipo di dominio effettore utilizzato, si identificano tre sottofamiglie di NLR. Gli NLR si ritrovano in una grande varietà di tipi cellulari, sebbene alcuni mostrino una distribuzione tissutale ristretta. Alcuni dei membri meglio caratterizzati sono espressi nelle cellule del sistema immunitario, in quelle infiammatorie e in quelle delle barriere epiteliali.

NOD1 e NOD2, membri della sottofamiglia contenente il dominio CARD, sono espressi nel citosol di diversi tipi cellulari (tra cui cellule mucosali epiteliali e fagocitiche) e rispondono ai peptidoglicani della parete batterica. NOD2 è espresso in maniera particolarmente abbondante dalle cellule di Paneth nell'intestino, dove, in risposta ai patogeni, stimola l'espressione di sostanze antimicrobiche chiamate defensine. NOD1 riconosce l'acido diaminopimelico (DAP) derivato prevalentemente da batteri Gram-negativi, mentre NOD2 riconosce una molecola, detta muramil dipeptide, derivata dall'acido diaminopimelico (DAP) dei batteri Gram-negativi e Gram-positivi. In questo secondo caso, i peptidi vengono trasportati all'interno della cellula ospite da meccanismi batterici specializzati, quali per esempio i sistemi di secrezione di tipo III e IV, che si sono evoluti nei batteri patogeni come strategia per veicolare le tossine. Quando gli oligomeri di NOD riconoscono il proprio ligando, per esempio una tossina batterica, avviene un cambiamento conformazionale che permette ai domini effettori CARD di reclutare numerose copie della chinasi RIP2, formando un complesso attivatorio definito "segnalosoma di NOD". Le chinasi RIP2 attivano NF-κB, il quale promuove l'espressione di geni infiammatori in modo analogo a quanto precedentemente descritto per la via MyD88-dipendente attivata dai TLR. Sia NOD1 sia NOD2 sono importanti per la risposta innata a patogeni batterici del tratto gastrointestinale, come *Helicobacter pylori* e *Listeria monocytogenes*.

Grande interesse ha destato la scoperta che alcuni polimorfismi di gene *NOD2* aumentano il rischio di contrarre una malattia infiammatoria dell'intestino crasso denominata *malattia di Crohn*. Una possibile spiegazione di questa associazione è che le varianti di NOD2 associate a malattia non riescono a percepire la presenza di prodotti microbici, dando in tal modo luogo a risposte innate difettose contro organismi

commensali e patogeni nell'intestino. Se questi organismi accedono alla parete intestinale, possono scatenare un'infiammazione cronica. Inoltre, mutazioni di NOD2 che generano varianti dotate di maggiore funzionalità sono associate all'insorgenza di una patologia infiammatoria sistemica detta *sindrome di Blau*.

La sottofamiglia di recettori di tipo NOD denominata NLRP risponde ai PAMP e ai DAMP citosolici formando complessi attivatori detti inflammasomi, che generano forme attive delle citochine infiammatorie IL-1 e IL-18 (Fig. 4-4). Esistono 14 NLRP (*NLR Family, Pyrin-Domain-Containing Proteins*), la maggior parte dei quali condivide un dominio effettore di tipo pirina. Il nome di questo dominio deriva dalla radice greca *pyro*, che significa fuoco, in quanto è stato identificato in un gene mutato responsabile di una malattia febbrile ereditaria. Sono stati studiati nel dettaglio solo gli inflammasomi assemblati da tre NLRP, IPAF/NLRC4, NLRP3 (detti anche criopirina) e NLRP1. Quando questi NLRP vengono attivati da prodotti microbici o da variazioni della concentrazione di molecole endogene legano altre proteine attraverso interazioni omotipiche tra domini strutturali condivisi, formando così il complesso dell'inflammasoma. Per esempio, dopo aver riconosciuto il rispettivo ligando, molti NLRP3 interagiscono a formare un oligomero all'interno del quale ciascuno lega un adattatore denominato ASC. Gli adattatori legano quindi il precursore inattivo dell'enzima caspasi-1 sfruttando l'interazione tra domini di reclutamento delle caspasi, presenti su entrambe le proteine. Le caspasi sono proteasi caratterizzate dalla presenza di residui di cisteina nel sito attivo che tagliano i substrati in corrispondenza di residui di aspartato. La caspasi-1 diviene attiva solo dopo essere stata reclutata dal complesso dell'inflammasoma. Sebbene la maggior parte delle caspasi sia coinvolta nell'attivazione di una particolare forma di morte cellulare detta *apoptosi* (vedi Cap. 15), la caspasi-1 serve principalmente per attivare i precursori di due citochine omologhe chiamate IL-1β e IL-18, il cui ruolo nella risposta infiammatoria verrà discusso più avanti in questo capitolo. Qui accenneremo solamente che l'infiammazione indotta dall'IL-1 protegge dai patogeni che hanno determinato la formazione dell'inflammasoma.

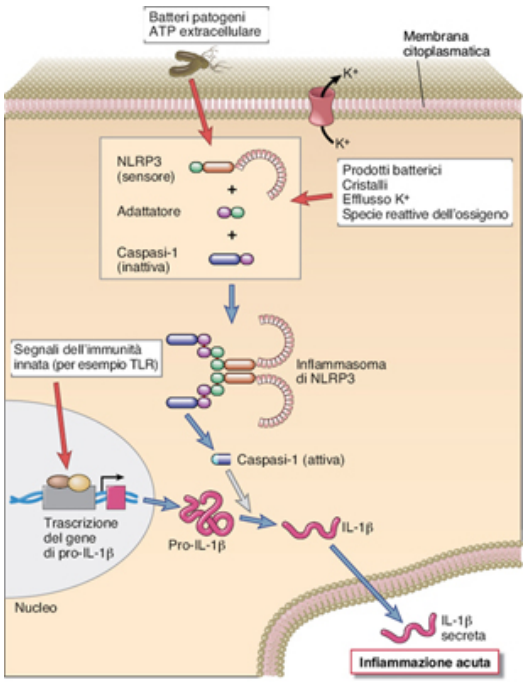


FIGURA 4-4 L'inflammasoma. Questa figura mostra l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3, che processa la pro-IL-1 in IL-1 attiva. L'inflammasoma con altri NLRP funziona in maniera analoga. Vari PAMP o DAMP inducono l'espressione di pro-IL-1β attraverso la trasduzione del segnale generata dai PRR.

L'inflammasoma di NLRP può essere attivato da una grande varietà di stimoli citoplasmatici associati a infezioni o stress cellulare tra cui prodotti microbici, cristalli ambientali o endogeni e riduzione della concentrazione citosolica di ioni potassio (Fig. 4-4). Tra i prodotti microbici ricordiamo molecole batteriche come la flagellina, il muramil dipeptide, l'LPS, tossine formanti pori e RNA batterici e virali. Potenti attivatori dell'inflammasoma sono anche le sostanze cristalline di origine ambientale, come l'asbesto e il silicio, o endogene, come l'urato monosodico, il calcio pirofosfato diidrato e il colesterolo. Un ulteriore stimolo endogeno è l'ATP extracellulare, probabilmente rilasciato da cellule morte e successivamente trasportato nel citoplasma.

La diversità strutturale degli agenti in grado di attivare l'inflammasoma suggerisce che essi non si leghino direttamente alle proteine NLRP ma che agiscano invece inducendo simili cambiamenti citoplasmatici che a loro volta attiverebbero gli NLRP. Per esempio, molti stimoli (tra cui alcune tossine batteriche formanti pori) incrementano l'efflusso di potassio citoplasmatico e, dunque, una ridotta concentrazione di questi ioni potrebbe rappresentare una modificazione citoplasmatica comune implicata nell'attivazione dell'inflammasoma. Un altro meccanismo comune è la generazione di specie reattive dell'ossigeno, ovvero radicali liberi tossici abbondantemente rilasciati in corso di danno cellulare.

L'attivazione dell'inflammasoma e della caspasi-1 può inoltre dare luogo a una forma di morte cellulare programmata detta piroptosi, caratterizzata da edema cellulare, perdita di integrità della membrana plasmatica e rilascio di mediatori infiammatori. La piroptosi causa la morte di certi microbi che accedono al citosol e potenziano il rilascio di IL-1β

generato dall'inflammasoma. Oltre che dalla caspasi-1, la piroptosi può anche essere causata dalla caspasi-11; questa forma di piroptosi sembra essere coinvolta nella protezione contro certi batteri che accedono immediatamente al citosol. Tuttavia, gli stimoli che attivano questa via non sono ancora del tutto conosciuti.

La scoperta che alcune sostanze cristalline attivano potentemente l'inflammasoma ha cambiato la visione di alcune patologie infiammatorie. La *gotta* è una condizione infiammatoria dolorosa causata dalla deposizione di cristalli di urato monosodico nelle articolazioni. Sapendo ora che tali sostanze attivano l'inflammasoma, gli antagonisti dell'IL-1 sono stati usati con efficacia nel trattamento dei casi più gravi, resistenti ai farmaci antinfiammatori convenzionali. Analogamente, la *pseudogotta* è causata dalla deposizione di cristalli di calcio pirofosfato. L'inalazione di silicio e asbesto per cause occupazionali determina infiammazione cronica e fibrosi del polmone e anche in questo caso si può pensare a una terapia atta a bloccare l'inflammasoma o l'IL-1.

L'attivazione non controllata dell'inflammasoma dovuta a mutazioni autosomiche delle proteine costituenti, determina un'attivazione inopportuna e un'eccessiva produzione di IL-1. Ne conseguono attacchi febbrili ricorrenti e risposte infiammatorie locali, più comunemente a livello delle articolazioni e del tratto intestinale. Questi disturbi sono detti CAPS (*Cryopyrin Associated Periodic Syndromes*) e rappresentano una frazione di un gruppo più ampio di sindromi febbrili periodiche con sintomi simili causati da una produzione eccessiva di citochine infiammatorie. Questi disturbi sono anche detti **sindromi autoinfiammatorie**, poiché si caratterizzano per un'infiammazione spontanea senza evidente causa scatenante. Tali patologie differiscono sostanzialmente dalle *malattie autoimmuni*, che sono patologie del sistema immunitario adattativo causate da anticorpi e/o linfociti T reattivi nei confronti di antigeni self. I pazienti affetti da CAPS possono essere trattati con efficacia con antagonisti dell'IL-1.

Grande interesse nell'inflammasoma è stato di recente suscitato da una serie di riscontri secondo i quali esso potrebbe essere attivato da eccessivi livelli di sostanze endogene depositate nei tessuti. Queste sostanze comprendono cristalli di colesterolo in corso di aterosclerosi, acidi grassi liberi e lipidi in corso di sindrome metabolica associata a obesità, e β-amiloide nella sindrome di Alzheimer. In tutti questi casi, l'attivazione dell'inflammasoma determina produzione di IL-1 e infiammazione, che possono contribuire alla patogenesi della malattia. Tali riscontri hanno promosso la conduzione di studi clinici volti a valutare gli effetti di antagonisti dell'IL-1 nel trattamento di queste patologie (cardiopatia aterosclerotica, diabete di tipo 2 associato a obesità).

Recettori di tipo RIG

***I recettori di tipo RIG (*RIG-Like Receptors, *RLR) sono sensori citosolici dell'RNA virale cui rispondono attivando la produzione di IFN di tipo I con funzione antivirale*.** Gli RLR riconoscono RNA a doppia elica ed eteroduplex di RNA-DNA, che includono il genoma di virus a RNA e i trascritti di RNA di virus a RNA e a DNA. I due RLR meglio caratterizzati sono RIG-I (*Retinoic Acid-Inducible Gene I*) e MDA5 (*Melanoma Differentiation-Associated Gene 5*). Entrambi contengono due domini *N*-terminali

responsabili del reclutamento delle caspasi, e altri due domini, una RNA elicasi e uno C-terminale, coinvolti nel riconoscimento dell'RNA. RIG-I e MDA5 riconoscono diversi tipi di RNA che sono caratteristici di virus diversi, sulla base della loro lunghezza. Gli RLR possono anche distinguere l'RNA virale a singola catena dai normali trascritti cellulari. Per esempio, RIG-I riconosce solo l'RNA caratterizzato dalla presenza di un estremità 5′ trifosfato, che non è presente nell'RNA citosolico delle cellule di mammifero perché viene rimosso oppure mascherato da un cappuccio di 7-metilguanosina. Gli RLR sono espressi da un'ampia varietà di tipi cellulari, inclusi i leucociti e molte cellule tissutali. In questo modo, molte cellule bersaglio di virus a RNA possono contribuire a innescare la risposta immunitaria innata contro tali virus.

Dopo aver legato l'RNA virale, gli RLR iniziano eventi di trasduzione del segnale che danno luogo a fosforilazione e attivazione di IRF3, IRF7 e NF-κB, i quali inducono la produzione di interferoni di tipo I.

Sensori di DNA citosolico e trasduzione del segnale mediata da STING

I sensori di DNA citosolico (CDS) sono molecole che rilevano la presenza di DNA nel citosol e attivano vie di trasduzione che avviano le risposte antimicrobiche, fra cui produzione di interferone di tipo 1 e autofagia. Il DNA può essere rilasciato nel citosol da vari microbi intracellulari in funzione di vari meccanismi. Sono stati identificati diversi sensori di DNA citosolico e diverse vie di trasduzione:

- ***Via di STING (*Stimulator of IFN Genes*): principale meccanismo di attivazione delle risposte mediate da interferone di tipo 1 da parte di DNA.*** STING è una proteina transmembrana localizzata nel reticolo endoplasmatico, ed è attivata indirettamente dal DNA microbico presente nel citosol. Il DNA citosolico si lega a un enzima detto GMP-AMP ciclico sintasi (cGAS) che produce un dinucleotide ciclico detto GMP-AMP ciclico (cGAMP). Il cGAMP interagisce quindi con STING e ne induce la traslocazione in vescicole derivate dal Golgi, dove promuove la fosforilazione di IRF3. IRF3 fosforilato a sua volta trasloca nel nucleo e induce l'espressione dei geni dell'interferone di tipo 1. STING stimola inoltre l'autofagia, un meccanismo in base al quale le cellule degradano i propri organelli, come i mitocondri, sequestrandoli all'interno di vescicole di membrana che si fondono con i lisosomi. Nell'immunità innata, l'autofagia è un meccanismo che serve a indirizzare i microbi dal citosol ai lisosomi, dove vengono uccisi ad opera di enzimi proteolitici.
- L'attivatore DNA-dipendente dei fattori regolatori dell'IFN (DAI) si lega al DNA proveniente da diversi tipi di microbi e attiva IRF3, avviando la produzione di IFN di tipo 1. DAI attiva anche la via di NF-κB.
- L'RNA polimerasi 3 si lega al DNA microbico, lo trascrive e l'RNA che ne deriva attiva la via di RIG, portando all'espressione dell'interferone di tipo 1, come descritto in precedenza.
- AIM2 (assente nel melanoma-2) è un altro CDS che riconosce il DNA citosolico a doppia elica. Forma un inflammasoma contenente caspasi-1 che processa pro-IL-1b e

pro-IL-18.

Altri recettori cellulari

Numerosi altri tipi di recettori presenti sulla membrana plasmatica e nel citoplasma trasmettono segnali di attivazione simili ai TLR, promuovendo risposte infiammatorie e potenziando l'uccisione dei microbi, oppure partecipando alla cattura dei microbi da parte dei fagociti (vedi Tab. 4-3).

Recettori per i carboidrati

I recettori che riconoscono i carboidrati presenti sulla superficie dei microbi facilitano la fagocitosi e la secrezione delle citochine che promuovono le successive risposte dell'immunità adattativa. Questi recettori appartengono alla famiglia delle lectine di tipo C, così chiamati perché legano carboidrati con un meccanismo Ca-dipendente e sono stati chiamati CLR (recettori della lectina di tipo C) per mantenere un parallelismo con la nomenclatura dei TLR e di altri recettori. Alcuni membri di questa famiglia sono proteine solubili disperse nel sangue e nei fluidi extracellulari che verranno trattate più avanti; altri sono proteine integrali di membrana che si ritrovano sulla superficie di macrofagi, cellule dendritiche e di alcune cellule presenti nei tessuti. Tutte queste molecole contengono un dominio conservato di riconoscimento dei carboidrati. Esistono diverse lectine di tipo C di membrana in grado di riconoscere carboidrati diversi, tra cui mannosio, glucosio, *N*-acetilglucosamina e β-glucani. In generale queste lectinericonoscono zuccheri caratteristici della parete cellulare dei microrganismi e assenti sulle cellule di mammifero. Alcune hanno un ruolo nella fagocitosi, mentre altre attivano risposte protettive contro i microbi.

- ***Recettori del mannosio***. Il **recettore del mannosio** (CD206) è una delle lectine di tipo-C di membrana più studiate ed è coinvolto nella fagocitosi. Questo recettore riconosce particolari zuccheri terminali quali D-mannosio, L-fucosio e *N*-acetil-D-glucosamina. Tali zuccheri sono frequenti sulla superficie dei microrganismi, mentre i carboidrati delle cellule eucariote terminano più spesso con galattosio e acido sialico. In altre parole, si può dire che anche gli zuccheri terminali dei carboidrati microbici possono essere considerati PAMP. Il recettore del mannosio non possiede alcuna funzione attivatoria intrinseca nota e sembra che il suo ruolo sia quello di legare i microbi per renderne possibile l'ingestione da parte di macrofagi e cellule dendritiche. Tuttavia la sua reale importanza per l'eliminazione dei patogeni attraverso la fagocitosi rimane sconosciuta.
- ***Dectine***. Dectin-1 (*Dendritic Cell-Associated C-Type Lectin 1*) e dectin-2 sono recettori espressi dalle cellule dendritiche. Essi sono importanti nel riconoscimento di funghi caratterizzati da un ciclo vitale a due stadi. Infatti, dectin-1 lega il β-glucano, che è il principale componente della forma lievito della *Candida albicans*, un fungo ubiquitario ma potenzialmente patogeno; invece dectin-2 riconosce gli oligosaccaridi

ricchi di mannosio della forma ifale. I ligandi delle dectine sono anche espressi su alcuni batteri e altri microbi. Entrambi i recettori, in risposta ai rispettivi ligandi fungini, inducono eventi di attivazione che stimolano la produzione di citochine e di altre proteine che promuovono l'infiammazione e amplificano la risposta immunitaria adattativa. Per esempio vengono indotte citochine che promuovono il differenziamento dei linfociti T naïve $CD4^+$ in cellule effettrici di tipo T_H17, particolarmente efficaci nella difesa dell'organismo contro le infezioni fungine e alcune infezioni batteriche.

- Altri esempi di recettori per i carboidrati delle cellule dendritiche includono la langherina (CD207), principalmente espressa dalle cellule di Langerhans a livello epidermico, e il DC-SIGN (CD209), espresso dalla maggioranza delle cellule dendritiche. DC-SIGN può anche avere un ruolo nella patogenesi dell'infezione da HIV-1, facilitando l'infezione dei linfociti T: infatti, la glicoproteina gp120 dell'envelope dell'HIV-1 lega DC-SIGN sulle cellule dendritiche localizzate nelle mucose, le quali attraverso i vasi linfatici trasportano il virus ai linfonodi drenanti propagando l'infezione ai linfociti T $CD4^+$.

Recettori scavenger

I **recettori scavenger** comprendono un insieme di proteine di membrana che si distinguono dal punto di vista strutturale e funzionale. Originariamente, esse erano state raggruppate in base alla caratteristica comune di legare le lipoproteine ossidate. Alcuni dei recettori scavenger, come per esempio SR-A e CD36, sono espressi dai macrofagi e sono coinvolti nella fagocitosi dei microrganismi. Inoltre, CD36 funziona come corecettore per l'eterodimero TLR2/6 nell'ambito della risposta agli acidi lipoteicoici e ai lipopeptidi diacetilati. Molte strutture molecolari possono legare molteplici recettori scavenger, tra cui ricordiamo LPS, acido lipoteicoico, acidi nucleici, β-glucano e proteine. La loro importanza nella risposta innata è evidenziata dall'aumentata suscettibilità alle infezioni dei topi knockout. Inoltre, è stato dimostrato che diversi fattori di virulenza microbici agiscono bloccando il riconoscimento e la fagocitosi mediata da questi recettori.

Recettori per i peptidi formilati

Il **recettore 1 per i peptidi formilati (FPR1)** è espresso dai leucociti, riconosce peptidi batterici contenenti residui *N*-formilmetioninici e stimola il movimento direzionale delle cellule. Poiché tutte le proteine batteriche, ma solo poche tra quelle dei mammiferi (per la precisione quelle sintetizzate nei mitocondri), iniziano con l'*N*-formilmetionina, FPR1 permette ai fagociti di identificare e rispondere preferenzialmente alle proteine batteriche. I ligandi di questo recettore sono fra i più potenti chemoattraenti mai identificati. I chemoattraenti comprendono diversi tipi di molecole che si diffondono dai siti di infezione, legano recettori specifici sulle cellule bersaglio e ne dirigono il movimento verso il sito di produzione del chemoattraente. Altri chemoattraenti, come le chemochine, descritte nel Capitolo 3, sono prodotte dalle cellule dell'ospite. FPR1, come pure tutti gli

altri recettori chemotattici, appartengono alla superfamiglia dei recettori a 7 domini transmembrana accoppiati alle proteine G che legano il guanosintrifosfato (*G Protein-Coupled Receptors*, GPCR). Questi recettori iniziano la trasduzione del segnale intracellulare attraverso le proteine G eterotrimeriche a essi associate e stimolano molte risposte cellulari, tra cui le modificazioni del citoscheletro che determinano un'aumentata mobilità cellulare (vedi Cap. 7).

CELLULE DELL'IMMUNITÀ INNATA

Le cellule dell'immunità innata fungono da sentinelle per l'identificazione della presenza di microbi e di cellule danneggiate, svolgendo funzioni essenziali per la difesa dell'ospite. Alcune costituiscono barriere fisiche che impediscono l'infezione, molte esprimono i diversi PRR che abbiamo appena presentato e, dopo aver riconosciuto i PAMP e i DAMP, rispondono producendo citochine infiammatorie e proteine antivirali e uccidendo i microbi o le cellule infettate. Inoltre, alcune cellule dell'immunità innata sono fondamentali per stimolare le successive risposte adattative.

Barriere epiteliali

Le superfici epiteliali integre costituiscono una barriera fisica tra i patogeni presenti nell'ambiente e i tessuti dell'ospite; inoltre le cellule epiteliali producono sostanze antimicrobiche che contrastano ulteriormente l'ingresso dei patogeni (Fig. 4-5). Le principali barriere poste all'interfaccia tra l'ambiente e l'ospite sono la *cute* e le *mucose* dei tratti gastrointestinale, respiratorio e genitourinario. Tali superfici sono rivestite da strati continui di cellule epiteliali specializzate che svolgono molte funzioni fisiologiche, tra cui l'inibizione dell'ingresso dei microbi. Se l'integrità di queste barriere viene meno, l'individuo diviene più suscettibile alle infezioni.

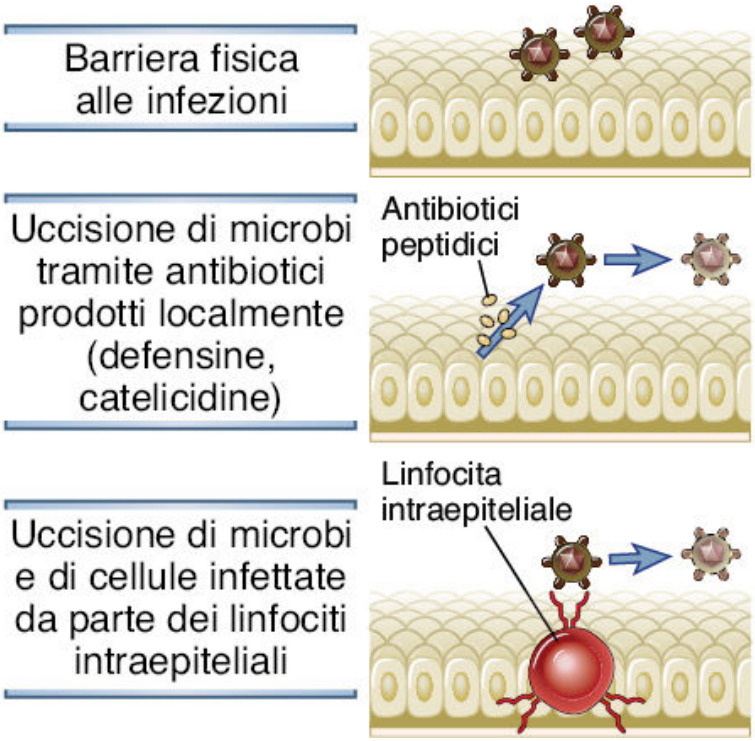


FIGURA 4-5 Barriere epiteliali. Gli epiteli presenti in corrispondenza delle vie di accesso dei microbi costituiscono barriere fisiche, producono sostanze antimicrobiche e ospitano linfociti intraepiteliali che si ritiene possano uccidere i microrganismi e le cellule infettate.

La funzione protettiva delle barriere epiteliali è in larga parte fisica. Infatti, le strette connessioni esistenti fra le cellule epiteliali rendono difficoltoso il passaggio dei patogeni tra cellula e cellula. Inoltre, anche lo strato esterno di cheratina che si forma in seguito alla morte dei cheratinociti sulla superficie cutanea contribuisce a bloccare la penetrazione dei microbi negli strati più profondi dell'epidermide. Infine il *muco*, una secrezione viscosa contenente glicoproteine, dette *mucine*, prodotto dalle cellule epiteliali dei tratti respiratorio, gastrointestinale e urogenitale, impedisce fisicamente l'invasione di questi distretti. La funzione di queste barriere è potenziata dall'azione delle ciglia nell'albero bronchiale e dalla peristalsi nell'intestino, che facilitano l'eliminazione dei microbi. Sebbene queste proprietà fisiche siano molto importanti per proteggere l'ospite, esse vengono ulteriormente complementate e integrate da altri meccanismi di difesa che descriveremo nei prossimi paragrafi.

Le cellule epiteliali e alcuni leucociti producono peptidi antimicrobici. Le defensine e le catelicidine rappresentano due famiglie di peptidi antimicrobici strutturalmente distinte.

- Le **defensine** sono piccoli peptidi lunghi da 29 a 34 aminoacidi che contengono regioni cationiche e idrofobiche e tre legami disolfurici intracatena. Le due famiglie di defensine umane, chiamate α e β, si distinguono per la posizione di questi legami. Le defensine sono prodotte dalle cellule epiteliali delle mucose, dai leucociti polimorfonucleati neutrofili, dalle cellule NK e dai linfociti T citotossici. I tipi di

defensine prodotti differiscono a seconda dei tipi cellulari. Il principale produttore di defensine α è rappresentato dalle cellule di Paneth nelle cripte dell'intestino tenue. Le defensine generate dalle cellule di Paneth sono talvolta chiamate *cripticidine* e servono a limitare la quantità di microbi presenti nel lume intestinale. Le defensine originano anche in altri tratti dell'intestino, nelle cellule della mucosa respiratoria e nella cute. Alcune defensine sono espresse costitutivamente, ma la loro produzione viene generalmente aumentata dalle citochine e dai prodotti microbici. In altri tipi cellulari, le defensine sono prodotte esclusivamente in risposta a citochine e prodotti microbici. Le azioni protettive delle defensine includono la tossicità diretta verso i microbi, compresi funghi, batteri e virus e l'attivazione delle cellule coinvolte nelle risposte antimicrobiche. Le defensine uccidono i microbi tramite diversi meccanismi, molti dei quali dipendono dalla loro capacità di inserirsi e alterare le funzioni delle membrane microbiche.

- Le **catelicidine** sono prodotte dai neutrofili, dalle cellule epiteliali della cute e dalle cellule della mucosa gastrointestinale e del tratto respiratorio. Le catelicidine sono prodotte come precursori di 18 kD e sono costituite da due domini che vengono poi tagliati proteoliticamente in due peptidi, ognuno dotato di funzioni protettive. Sia la sintesi del precursore, sia il taglio proteoliticosono stimolati da citochine infiammatorie e da prodotti microbici. Le catelicidine proteggono dalle infezioni attraverso meccanismi multipli, tra cui la tossicità diretta verso un'ampia gamma di microrganismi e l'attivazione di svariate risposte da parte dei leucociti e di altri tipi cellulari, che promuovono l'eradicazione dei microbi. Il frammento C-terminale, chiamato LL-37, è in grado di legare e neutralizzare l'LPS, una componente della parete esterna dei batteri Gram-negativi già menzionata precedentemente. LL-37 svolge anche un ruolo antinfiammatorio legandosi al DNA e bloccando l'attivazione dell'inflammasoma AIM2.

Le barriere epiteliali contengono alcuni tipi di linfociti, tra cui i linfociti T intraepiteliali, che riconoscono i microrganismi più comuni e rispondono ad essi. I linfociti T intraepiteliali sono presenti nell'epidermide e negli epiteli delle mucose. Varie sottopopolazioni di linfociti intraepiteliali sono presenti in proporzioni diverse a seconda della specie e del tessuto preso in considerazione. Queste sottopopolazioni si distinguono soprattutto per il tipo di recettore per l'antigene (*T Cell Receptor,* TCR) che esprimono. Alcuni linfociti T intraepiteliali esprimono la forma convenzionale αβ del TCR, presente nella maggior parte delle cellule T dei tessuti linfoidi e nel torrente ematico. Altri esprimono una forma di recettore per l'antigene detta TCR γδ, che riconosce antigeni peptidici e non peptidici. Una caratteristica comune di questi linfociti T è la limitata diversificazione del loro recettore per l'antigene, se paragonata alla maggior parte dei linfociti T. Si pensa che i linfociti T intraepiteliali riconoscano un numero limitato di strutture microbiche ampiamente distribuite. Essi contribuirebbero alla difesa dell'ospite attraverso la secrezione di citochine, l'attivazione dei fagociti e l'uccisione delle cellule infettate.

Cellule fagocitiche

Le cellule con funzioni fagocitiche, principalmente i macrofagi e i neutrofili, rappresentano la prima linea di difesa contro i microbi che superano le barriere epiteliali. Abbiamo introdotto questi tipi cellulari nel Capitolo 2 e discuteremo molti altri dettagli della loro funzione nel contesto della risposta infiammatoria più avanti in questo capitolo. Il ruolo essenziale dei fagociti nelle difese innate contro i microbi è dimostrato dall'alto numero di infezioni letali, provocate da batteri e funghi, che si registrano nei pazienti affetti da deficienze genetiche nelle funzioni di queste cellule, oppure quando il numero dei neutrofili circolanti si riduce a causa di tumori del midollo osseo o di terapie antitumorali.

Cellule dendritiche

Le cellule dendritiche hanno funzioni di riconoscimento ed effettrici essenziali per l'immunità innata. Abbiamo introdotto le cellule dendritiche nel Capitolo 2, mentre il loro ruolo nella presentazione dell'antigene ai linfociti T verrà discusso nel Capitolo 6. Ricordiamo qui che il termine "cellule dendritiche" indica di fatto una famiglia eterogenea di cellule i cui lunghi processi citoplasmatici ricordano i dendriti. Esse sono costitutivamente presenti negli epiteli e nella maggior parte dei tessuti. Grazie alla loro localizzazione e alla loro morfologia, queste cellule sono cruciali per individuare l'ingresso di eventuali patogeni. Inoltre, le cellule dendritiche esprimono la più vasta gamma di TLR e PRR citoplasmatici e rappresentano i più versatili sensori dei PAMP e dei DAMP dell'intero organismo. Le cellule dendritiche plasmacitoidi, una particolare classe di cellule dendritiche, così denominate perché morfologicamente ricordano le plasmacellule, sono le principali produttrici di IFN di tipo I, citochine prodotte in risposta alle infezioni virali. Tale caratteristica dipende, almeno in parte, dal fatto che queste cellule esprimono in maniera particolarmente abbondante i TLR endosomiali (TLR 3, 7, 8, 9) che riconoscono gli acidi nucleici dei virus internalizzati. Discuteremo dettagliatamente le proprietà antivirali degli IFN di tipo I più avanti in questo capitolo.

Le cellule dendritiche hanno la capacità esclusiva di attivare e indirizzare le risposte immunitarie adattative dei linfociti T. Infatti, le cellule dendritiche sono particolarmente efficienti nell'inglobare e trasportare ai linfonodi antigeni microbici proteici, i quali vengono poi espressi sulla membrana in una forma tale che possa essere riconosciuta dai linfociti T naïve (vedi Cap. 6). La risposta innata delle cellule dendritiche ai PAMP, in particolare l'attivazione dei TLR, migliora la capacità di processare e presentare gli antigeni. Infatti, la trasduzione del segnale innescata dai TLR induce nelle cellule dendritiche l'espressione di molecole costimolatorie e di citochine, necessarie per una robusta attivazione dei linfociti T naïve e per un loro efficiente differenziamento in cellule effettrici. Anticipiamo qui che, a seconda della natura del patogeno riconosciuto, la cellula dendritica può indirizzare il differenziamento dei linfociti T naïve verso tipi di cellule effettrici diverse, come i T_H1 che producono l'IFN-γ o i T_H17 che producono l'IL-17.

L’influenza delle cellule dendritiche sull’attivazione e sul differenziamento dei linfociti T sarà discussa nel Capitolo 9.

Cellule natural killer e altre cellule linfoidi innate

Le cellule linfoidi innate (*Innate Lymphoid Cells*, ILC), che sono state introdotte nel Capitolo 2, sono cellule di origine midollare dotate di morfologia linfoide, che assolvono a diverse funzioni antimicrobiche. Queste cellule originano da un comune precursore localizzato nel midollo osseo, identificabile dall’espressione del fattore di trascrizione Id2, dipendono da IL-7 o, in un caso, da IL-15 per lo sviluppo e, diversamente dai linfociti dell’immunità adattativa, svolgono funzioni effettrici senza la necessità di espansione clonale e differenziazione. Le ILC si avvalgono di diversi meccanismi effettori condivisi con i linfociti T, in particolare la capacità di produrre varie citochine, ma non riarrangiano i geni del recettore per l’antigene e non esprimono TCR. Esistono tre principali sottopopolazioni di cellule linfoidi innate, che si distinguono per le citochine che producono (Fig. 4-6). Ciascun tipo può essere ulteriormente suddiviso in ulteriori sottopopolazioni in base alle molecole di membrana che esprimono e ai meccanismi effettori che usano per assolvere alle proprie funzioni protettive (trattate in breve di seguito).

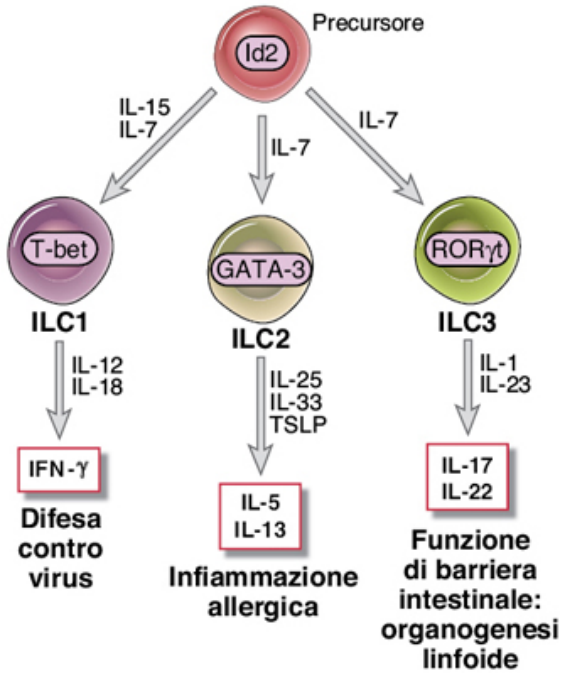


FIGURA 4-6 Cellule linfoidi innate. Esistono tre principali sottopopolazioni di cellule linfoidi innate (ILC) che originano tutte da un comune precursore midollare identificabile per l’espressione del fattore di trascrizione Id2. Ciascuna sottopopolazione è caratterizzata dall’espressione di fattori di trascrizione diversi e dalla produzione di differenti tipi di citochine in seguito ad attivazione. Sono illustrate le citochine che promuovono la differenziazione nelle sottopopolazioni ILC1, 2 o 3, le citochine che attivano le ILC a produrre le citochine specifiche di ciascuna sottopopolazione. Sono anche indicate le principali funzioni conosciute delle ILC.

Cellule natural killer

Le cellule natural killer (NK), le prime e meglio descritte cellule linfoidi innate, sono un sottotipo delle ILC1, che svolgono un ruolo importante nella risposta innata contro virus e batteri intracellulari. Il termine *natural killer* deriva dal fatto che la loro principale funzione è uccidere le cellule infettate, analogamente alle cellule killer del sistema immunitario adattativo, i linfociti T citotossici (CTL); tuttavia le cellule NK svolgono questa funzione senza il bisogno di subire alcuna ulteriore differenziazione (da qui il nome *natural*). Le cellule NK costituiscono il 5-15% delle cellule mononucleate presenti nel sangue e nella milza. Negli altri organi linfoidi sono rare, ma sono più abbondanti in organi particolari quali il fegato e l'utero gravido. In circolo, le cellule NK appaiono come grandi linfociti con numerosi granuli citoplasmatici. Le cellule NK, a differenza dei linfociti T e B, non esprimono recettori per l'antigene distribuiti clonalmente; per distinguere le cellule normali dalle cellule infettate utilizzano infatti recettori codificati dal DNA della linea germinativa, che saranno descritti più avanti. Nel sangue, possono essere riconosciute per l'espressione in membrana di CD56 e l'assenza di CD3, il marcatore dei linfociti T. Nell'uomo, la maggioranza delle cellule NK esprime anche CD16, che è coinvolto nel riconoscimento di cellule rivestite da anticorpi.

Funzioni delle cellule NK

Le funzioni effettrici delle cellule NK sono l'uccisione delle cellule infettate e la produzione di IFN-γ, una citochina che attiva le funzioni microbicide dei macrofagi nei confronti dei microbi fagocitati (Fig. 4-7). I meccanismi di citotossicità delle cellule NK sono essenzialmente analoghi a quelli dei linfociti $CD8^+$ citotossici, che descriveremo in dettaglio nel Capitolo 11. Le cellule NK, come i CTL, possiedono granuli che contengono le proteine responsabili dell'uccisione delle cellule bersaglio. Quando le cellule NK sono attivate, l'esocitosi dei granuli rilascia queste proteine in prossimità delle cellule bersaglio. Una proteina contenuta nei granuli delle cellule NK, chiamata **perforina**, agevola l'ingresso di altre proteine contenute nei granuli, i **granzimi**, nel citosol delle cellule bersaglio. I granzimi sono enzimi che avviano una sequenza di eventi di attivazione che causano la morte per apoptosi delle cellule bersaglio. Uccidendo le cellule infettate da virus e da batteri intracellulari, le cellule NK eliminano i serbatoi di microbi infettivi. Nella fase iniziale di un'infezione virale le citochine IL-12 e IL-15 inducono l'espansione e l'attivazione delle cellule NK e l'uccisione delle cellule infettate e questo evento precede l'attivazione dei linfociti CTL. Le cellule NK svolgono un ruolo rilevante anche più avanti, nel corso dell'infezione virale, uccidendo le cellule infettate che sono sfuggite all'attacco dei CTL, riducendo l'espressione delle molecole MHC di classe I. Alcuni tumori, specialmente quelli di origine ematopoietica, sono un tipico bersaglio delle cellule NK, verosimilmente proprio perché le cellule tumorali non esprimono normali livelli di molecole MHC di classe I.

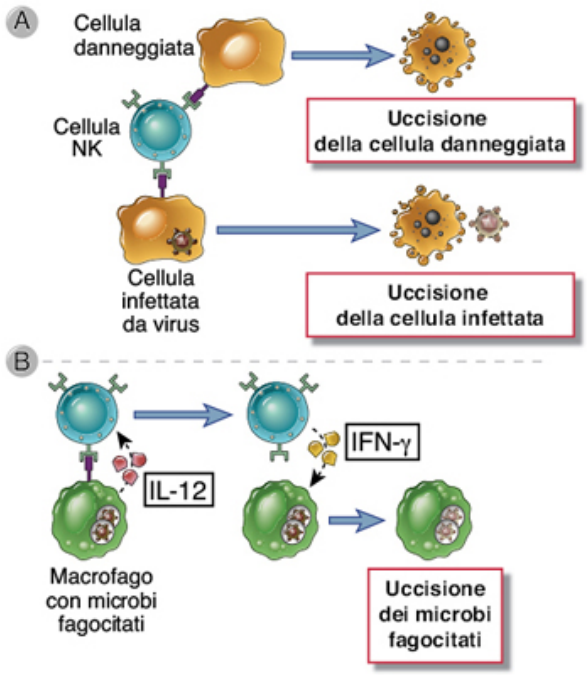


FIGURA 4-7 Funzioni delle cellule NK. A. Le cellule NK riconoscono e uccidono le cellule infettate o le cellule che subiscono altri tipi di alterazioni che esprimono particolari ligandi. In questo modo, le cellule NK eliminano i serbatoi di infezione e le cellule non più funzionali. **B.** Le cellule NK rispondono a IL-12 prodotta dai macrofagi e secernono IFN-γ che attiva le funzioni microbicide dei macrofagi.

L'IFN-γ prodotto dalle cellule NK aumenta la capacità dei macrofagi di uccidere i batteri fagocitati, analogamente all'IFN-γ prodotto dai linfociti T (vedi Cap. 10).Questa interazione NK-macrofago che dipende dall'IFN-γ è in grado di tenere sotto controllo un'infezione da batteri intracellulari come *Listeria monocytogenes* per diversi giorni o settimane, dando tempo alla risposta adattativa dei linfociti T di svilupparsi e di eradicare l'infezione. L'IFN-γ prodotto nei linfonodi dalle cellule NK può inoltre indirizzare la differenziazione dei linfociti T naïve in cellule T_H1 (vedi Cap. 10). Alcune cellule NK umane non esprimono CD16 e sono citotossiche: queste cellule sono caratterizzate dalla capacità di produrre abbondanti quantità di IFN-γ. Come prevedibile, la deplezione delle cellule NK determina un aumento della suscettibilità alle infezioni da parte di alcuni virus e batteri intracellulari. Nei topi che presentano un deficit di linfociti T, la risposta delle cellule NK è sufficiente a tenere sotto controllo l'infezione da questi microbi per un certo periodo, ma in ultima analisi l'animale soccombe in assenza dell'immunità mediata dai linfociti T.

Recettori attivatori e inibitori delle cellule NK

Le cellule NK sono in grado di distinguere le cellule infettate e alterate da quelle sane. Le loro funzioni dipendono dall'equilibrio tra i segnali generati dai recettori attivatori e inibitori. Questi recettori riconoscono molecole espresse da altre cellule e generano segnali che promuovono o inibiscono le risposte delle cellule NK. I recettori attivatori

stimolano le proteine chinasi che trasducono il segnale mediante fosforilazione dei substrati a valle, mentre i recettori inibitori stimolano le fosfatasi che contrastano l'azione delle chinasi. Tratteremo in dettaglio la trasduzione del segnale dei recettori delle cellule NK più avanti in questo capitolo. In generale, i recettori attivatori riconoscono ligandi che sono presenti sulle cellule infettate e danneggiate, che devono essere eliminate, mentre i recettori inibitori riconoscono segnali espressi dalle cellule sane, che devono essere preservate (Fig. 4-8). Il risultato dell'interazione di una cellula NK con una cellula bersaglio è determinato dall'integrazione dei segnali generati dal pannello di recettori inibitori e attivatori espressi dalla cellula NK che interagiscono con i ligandi presenti sulla cellula bersaglio. Il coinvolgimento dei recettori attivatori stimola l'uccisione da parte delle cellule NK dando luogo all'eliminazione delle cellule danneggiate o infette. Viceversa, il coinvolgimento dei recettori inibitori disattiva le funzioni effettrici delle cellule NK e previene l'uccisione delle cellule sane. Il pannello di recettori espresso dalle diverse cellule NK nei vari individui è molto variabile, dal momento che questi vengono espressi in maniera stocastica: perciò, le singole cellule NK anche nello stesso individuo possono rispondere a tipi diversi di microbi o cellule infettate. Inoltre, i geni che codificano per molti di questi recettori sono polimorfi (ovvero ne esistono molte varianti all'interno della popolazione) e dunque ciascun individuo esprimerà una forma di recettore leggermente diversa.

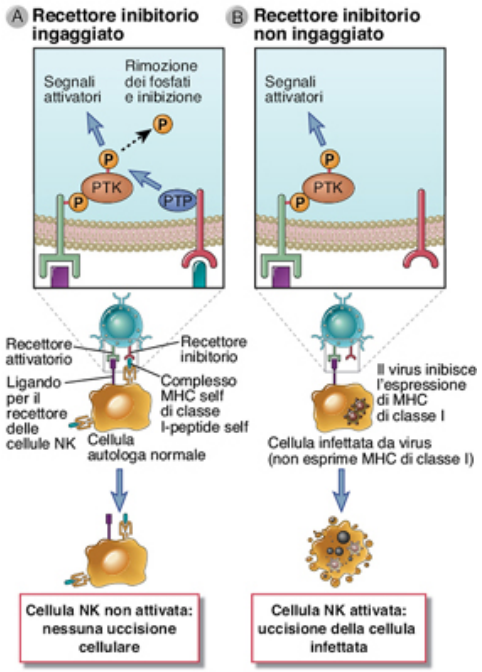


FIGURA 4-8 Funzioni dei recettori attivatori e inibitori delle cellule NK. A. I recettori attivatori delle cellule NK riconoscono i ligandi sulle cellule bersaglio e attivano le tirosino chinasi (PTK), la cui attività è inibita dai recettori inibitori che riconoscono le molecole MHC di classe I che attivano le tirosinfosfatasi (PTP). Le cellule NK non uccidono efficientemente le cellule normali che esprimono molecole MHC di classe I. **B.** Se un'infezione virale o un altro tipo di danno inibisce l'espressione delle molecole MHC di classe I e induce l'espressione di ligandi attivatori, i recettori inibitori delle cellule NK non vengono ingaggiati e la funzione dei recettori attivatori non incontra ostacoli nell'innescare le risposte delle cellule NK, come la citolisi e la secrezione di citochine. Inoltre, le cellule alterate da infezioni o dalla trasformazione neoplastica possono cominciare a esprimere molteplici molecole attivatorie, le quali legano i recettori attivatori delle NK e inducono un livello di fosforilazione delle tirosine superiore a quello che può essere rimosso dalle fosfatasi associate ai recettori inibitori, cosicché la cellula alterata può essere uccisa (non mostrato in figura). Per i dettagli sulla struttura e i ligandi di questi recettori si rimanda alla Figura 4-9.

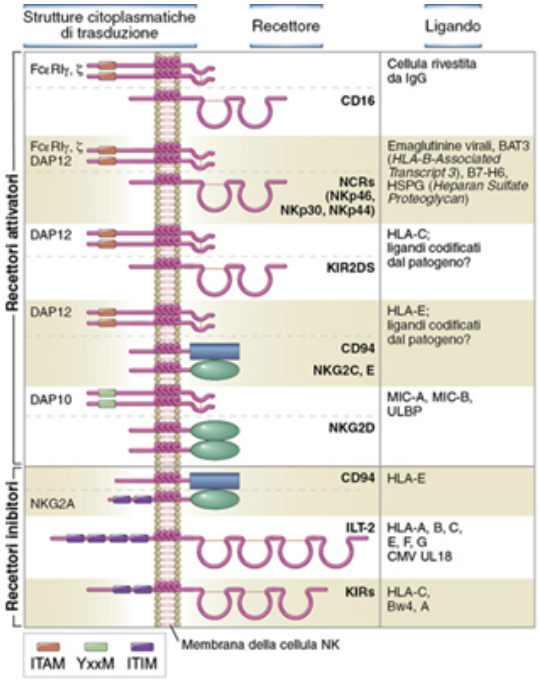


FIGURA 4-9 Struttura e ligandi dei recettori attivatori e inibitori delle cellule NK. I recettori attivatori e inibitori sono indicati in *grassetto*. CD16 e NCR (*Natural Cytotoxic Receptor*) si associano con omodimeri di catene ζ, omodimeri di FcεRIγ oppure eterodimeri composti dalle due catene. Esistono molteplici KIR che riconoscono ligandi diversi.

I recettori attivatori delle cellule NK riconoscono un gruppo eterogeneo di ligandi, alcuni dei quali possono essere espressi da cellule normali, mentre altri principalmente da cellule che hanno subito danni, cellule infettate da microbi o trasformate. (Fig. 4-9). Molti dei recettori attivatori delle cellule NK sono chiamati **recettori KIR (*Killer cell Immunoglobulin [Ig]-like Receptors*)** poiché contengono un dominio strutturale Ig, inizialmente identificato negli anticorpi, di cui si è trattato nel Capitolo 5. Tutte le proteine che possiedono domini Ig sono membri della superfamiglia delle Ig. Un secondo importante gruppo di recettori NK attivatori appartiene alla famiglia delle lectine di tipo C, che sono proteine con proprietà di legame ai carboidrati. Alcuni dei recettori attivatori riconoscono le molecole MHC di classe I, una proprietà importante che caratterizza i recettori inibitori, come vedremo più avanti. L'importanza del riconoscimento delle molecole MHC di classe I da parte dei recettori attivatori non è nota. Altri recettori

attivatori riconoscono ligandi diversi dalle classiche molecole MHC. Uno di questi, oggetto di studi approfonditi, appartiene alla famiglia delle lectine di tipo C ed è chiamato NKG2D. Questo recettore si lega a proteine simili alle molecole MHC di classe I, fra cui MIC-A e MIC-B che sono espresse da cellule infettate da virus e cellule tumorali ma non da cellule normali. Il recettore NKG2D si associa a una subunità di trasduzione chiamata DAP10, che invia segnali che promuovono la citotossicità delle cellule NK nei confronti delle cellule bersaglio.

Un altro recettore attivatorio è CD16 (FcγRIIIA), un recettore a bassa affinità per le IgG. Gli anticorpi presentano una porzione variabile che lega l'antigene ed una porzione costante, detta regione Fc, che interagisce con varie molecole del sistema immunitario. Descriveremo la struttura degli anticorpi nel Capitolo 5; per il momento è sufficiente sapere che CD16 si lega alle regioni Fc di anticorpi delle classi IgG1 e IgG3 e trasduce il segnale associandosi a una delle tre diverse catene di attivazione (per esempio FcεRIγ, ζ e proteine DAP12). Nel corso di un'infezione, il sistema immunitario adattativo produce anticorpi IgG1 e IgG3 che legano gli antigeni microbici espressi sulla superficie delle cellule infettate e vengono riconosciuti da CD16 espresso dalle cellule NK. Di conseguenza, CD16 genera segnali che attivano le cellule NK a uccidere le cellule che sono state rivestite dagli anticorpi. Questo processo è chiamato **citotossicità cellulare-anticorpo-dipendente** e rappresenta una funzione effettrice dell'immunità adattativa che tratteremo nel Capitolo 13, quando prenderemo in esame l'immunità umorale.

La maggior parte delle cellule NK esprime recettori inibitori che riconoscono molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (**Major Histocompatibility Complex*, MHC) di classe I, proteine di membrana normalmente espresse da tutte le cellule nucleate*** (Fig. 4-9). La funzione principale delle molecole MHC di classe I è esporre sulla membrana peptidi che derivano da proteine citoplasmatiche endogene o microbiche, in modo che possano essere riconosciute dai linfociti T. Questa funzione e i dettagli strutturali delle molecole MHC di classe I verranno discussi nel Capitolo 6. Al momento, è fondamentale ricordare solamente che le cellule NK riconoscono le molecole MHC di classe I utilizzando recettori del tutto diversi da quelli dei linfociti T e per lo più a funzione inibitoria. Questo permette alle cellule NK di discriminare tra le cellule normali, che esprimono le molecole MHC di classe I, e quelle infettate o alterate che tendono a perdere tale espressione. Possiamo dire che le cellule NK interpretano la presenza delle molecole MHC di classe I come espressione di self integro e la sua assenza come indicazione di infezione o danno. Di conseguenza, le cellule NK saranno inibite da cellule sane ma non riceveranno segnali inibitori da cellule infette o alterate. In questo caso la cellula si attiverà per il rilascio di citochine e l'uccisione della cellula infettata o alterata. La capacità delle cellule NK di essere attivate da cellule self che non esprimono le molecole MHC di classe I viene definita *riconoscimento del self mancante* (*missing self*).

La principale classe di recettori inibitori delle cellule NK sono i KIR, che si legano a una varietà di molecole MHC di classe I. Altri recettori inibitori sono i recettori lectinici, come l'eterodimero CD94/NKG2A, che riconosce una molecola MHC di classe I definita HLA-E. HLA-E lega peptidi che derivano da altre molecole MHC di classe I; pertanto,

CD94/NKG2A è un recettore che rileva la presenza di diversi tipi di molecole MHC di classe I. Una terza famiglia di recettori inibitori, chiamati recettori LIR (*Leukocyte Ig-like Receptors*) è composta da membri della superfamiglia delle Ig che si legano alle molecole MHC di classe I, anche se con minore affinità rispetto ai KIR, e sono maggiormente espressi dai linfociti B rispetto alle cellule NK.

I recettori attivatori e inibitori delle cellule NK contengono motivi strutturali nelle code citoplasmatiche, che innescano meccanismi di trasduzione che promuovono o inibiscono l'uccisione delle cellule bersaglio e la secrezione delle citochine (vedi Figg. 4-8 e 4-9). I recettori attivatori presentano motivi **ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*)**, che contengono residui di tirosina che, in seguito all'attivazione del recettore, vengono fosforilati da parte di chinasi citoplasmatiche. Altre proteine chinasi vengono reclutate dagli ITAM fosforilati e dopo attivazione fosforilano a loro volta ulteriori proteine, contribuendo alla cascata di eventi che porta in ultima analisi all'attività citotossica e alla secrezione di citochine. Gli ITAM sono inoltre presenti nelle code citoplasmatiche di altre catene di trasduzione di recettori del sistema immunitario, fra cui il recettore per l'antigene dei linfociti T e B, di cui tratteremo struttura e funzioni nel Capitolo 7. In alcuni recettori attivatori, una singola catena polipeptidica contiene sia la sequenza ITAM sia la porzione di legame per il ligando. In altri, gli ITAM sono localizzati in catene polipeptidiche distinte, quali FcεRIγ, ζ e DAP12, che non legano direttamente il ligando, ma che si associano in modo non covalente alla catena che interagisce con il ligando.

I recettori inibitori delle cellule NK presentano, nelle code citoplasmatiche, un **motivo strutturale comune detto ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine based Inhibition Motif*)**, il quale ingaggia molecole che bloccano le vie di trasduzione dei recettori attivatori (vedi Figg. 4-8 e 4-9). I domini ITIM contengono residui di tirosina che vengono fosforilati in seguito al riconoscimento del ligando. Questo porta al reclutamento e all'attivazione di fosfatasi che rimuovono i fosfati dalle proteine e dai lipidi attivati dai recettori attivatori, con conseguente blocco dei segnali trasmessi dai recettori attivatori. I motivi ITIM si trovano anche nelle code citoplasmatiche di altri recettori che verranno discussi più in dettaglio nel Capitolo 7.

I geni *KIR* sono polimorfi, ovvero ne esistono diverse varianti alleliche. Gli alleli vengono spesso ereditati in gruppi, detti *aplotipi*. Esistono due aplotipi KIR prevalenti e alcuni più rari. Gli aplotipi differiscono per il numero di recettori codificati e in particolare alcuni aplotipi comprendono un numero diverso di recettori attivatori rispetto ad altri. Alcuni aplotipi sono associati all'aumentata suscettibilità ad alcune patologie, quali l'aborto spontaneo e l'uveite.

Le citochine possono potenziare le risposte delle cellule NK. Le principali citochine del sistema immunitario innato che stimolano la funzione delle cellule NK sono IL-12, IL-15, IL-18 e gli interferoni di tipo I (trattati più avanti). Ciascuna di queste citochine potenzia l'attività citotossica e stimola la secrezione di IFN-γ indipendentemente dai recettori attivatori. Inoltre, IL-12 e IL-15 sono importanti fattori di crescita per le cellule NK.

Altre cellule linfoidi innate

Le tre sottopopolazioni di cellule linfoidi innate, il Gruppo 1 (che comprende le cellule NK), il Gruppo 2 e il Gruppo 3, producono diversi tipi di citochine e partecipano sia alla difesa dell'ospite contro diversi patogeni sia alla patogenesi di diverse malattie infiammatorie. Queste sottopopolazioni sono analoghe alle sottopopolazioni di linfociti T $CD4^+$ T_H1, T_H2 e T_H17 che secernono le stesse citochine (vedi Fig. 4-6). Le ILC di Gruppo 1 producono IFN-γ e comprendono le cellule NK citotossiche e non citotossiche descritte in precedenza. Le ILC di Gruppo 2, come i linfociti $CD4^+$ T_H2 secernono IL-5, IL-9 e IL-13, ed esprimono il fattore di trascrizione GATA2. Queste cellule proteggono i topi da infezioni elmintiche e contribuiscono allo sviluppo di malattie allergiche. Le ILC di Gruppo 3producono IL-22 e/o IL-17 ed esprimono il fattore di trascrizione RORγt, caratteristiche condivise dai linfociti $CD4^+$ T_H17. Le ILC di Gruppo 3 si trovano nei siti mucosali e prendono parte al processo di difesa nei confronti dei batteri extracellulari e al mantenimento dell'integrità delle barriere epiteliali. Le ILC di Gruppo 3 comprendono anche le cellule LTi (*Lymphoid Tissue-inducer*)che, oltre a secernere IL-17 e IL-22, esprimono sulla membrana linfotossina-α e secernono TNF, citochine necessarie al normale sviluppo degli organi linfoidi (vedi Cap. 2).

Linfociti T e B dotati di recettori poco diversificati

Come discuteremo dettagliatamente più avanti, i linfociti T e B sono per lo più componenti dell'immunità adattativa, caratterizzati da un repertorio molto diversificato di specificità per gli antigeni. Tuttavia, certe piccole popolazioni di linfociti esprimono recettori per gli antigeni che sono strutturalmente uguali a quelli dei linfociti T e B, ma presentano una diversificazione molto limitata. Sembra che queste popolazioni di linfociti T e B possano riconoscere strutture conservate di specie microbiche comuni. I linfociti T a limitata diversificazione del recettore per l'antigene includono le cellule NKT (*invariant Natural Killer T cells*, iNKT), i linfociti T γδ e i linfociti T αβ intraepiteliali che sono stati precedentemente descritti. Le popolazioni B che producono anticorpi a specificità limitata includono i linfociti splenici della zona marginale e i linfociti B-1. Sebbene questi linfociti T e B abbiano funzioni simili a quelle degli altri linfociti, la natura della loro specificità li colloca tra le cellule dell'immunità innata. Queste particolari sottopopolazioni di linfociti T e B verranno descritte nei Capitoli 10 e 12 rispettivamente.

Mastociti

I mastociti sono presenti nella cute e nell'epitelio delle mucose e, in risposta alle infezioni e ad altri stimoli, secernono rapidamente citochine proinfiammatorie e mediatori lipidici. Abbiamo introdotto i mastociti nel Capitolo 2; ricordiamo qui che essi presentano numerosi granuli citoplasmatici contenenti diversi mediatori infiammatori che vengono rilasciati quando la cellula viene attivata da prodotti microbici oppure da speciali meccanismi anticorpo-dipendenti. Il contenuto dei granuli comprende amine vasoattive,

come l’istamina, che determina vasodilatazione e aumento della permeabilità capillare, ed enzimi proteolitici, che possono uccidere i batteri o inattivare le tossine microbiche. I mastociti sintetizzano e secernono anche mediatori lipidici, come le prostaglandine, e citochine, come il fattore di necrosi tumorale (*Tumor Necrosis Factor*, TNF). Essendo solitamente localizzati accanto ai vasi sanguigni (vedi Fig. 2-1, *B*), la degranulazione determina rapidi cambiamenti vascolari che promuovono la risposta infiammatoria acuta. I mastociti esprimono i TLR, i cui ligandi possono indurre degranulazione. I topi privi di mastociti controllano in maniera poco efficiente le infezioni batteriche, probabilmente a causa di una risposta immunitaria innata deficitaria. Le sostanze prodotte dai mastociti conferiscono una difesa anche contro gli elminti e sono responsabili della sintomatologia delle malattie allergiche. Torneremo a parlare dettagliatamente dei mastociti nel Capitolo 20 in relazione alle patologie allergiche.

MOLECOLE SOLUBILI DI RICONOSCIMENTO ED EFFETTRICI DELL’IIMMUNITÀ INNATA

Nel sangue e nei fluidi extracellulari sono disperse molecole in grado di riconoscere i microbi e promuovere la risposta innata. Queste molecole assicurano una difesa precoce contro patogeni che durante alcune fasi del proprio ciclo vitale hanno una localizzazione extracellulare. Queste molecole effettrici funzionano principalmente in due modi.

- Legandosi ai microbi funzionano come **opsonine**, cioè ne favoriscono la fagocitosi da parte di macrofagi, neutrofili e cellule dendritiche. Infatti, i fagociti esprimono specifici recettori di membrana per le opsonine che permettono l’internalizzazione del complesso opsonina-microbo.
- Dopo aver legato i microbi, promuovono risposte infiammatorie che attirano nuovi fagociti nel tessuto infettato. Possono inoltre provocare direttamente la morte dei microbi.

Le molecole effettrici solubili rappresentano il ramo umorale dell’immunità innata, così come gli anticorpi costituiscono il ramo umorale dell’immunità adattativa. I principali componenti dell’immunità innata umorale sono gli anticorpi naturali, il sistema del complemento, le collectine, le pentrassine e le ficoline. Nei prossimi paragrafi ne descriveremo le principali caratteristiche e funzioni.

Sistema del complemento

Il sistema del complemento comprende numerose proteine plasmatiche che collaborano fra loro con il triplice scopo di opsonizzare i microbi, promuovere il reclutamento dei fagociti e, in alcuni casi, uccidere direttamente il microbo (Fig. 4-10). L’attivazione del complemento consiste in una cascata proteolitica nella quale un precursore enzimatico

inattivo, detto *zimogeno*, viene modificato per diventare una proteasi attiva che taglia la proteina successiva della cascata inducendone l'attività proteolitica. La cascata enzimatica determina una straordinaria amplificazione della quantità di prodotti proteolitici che vengono generati. Questi prodotti svolgono le funzioni effettrici del sistema del complemento. Oltre al sistema del complemento, altre cascate proteolitiche clinicamente importanti sono la coagulazione e il sistema chinina-callicreina, che regola la permeabilità vascolare.

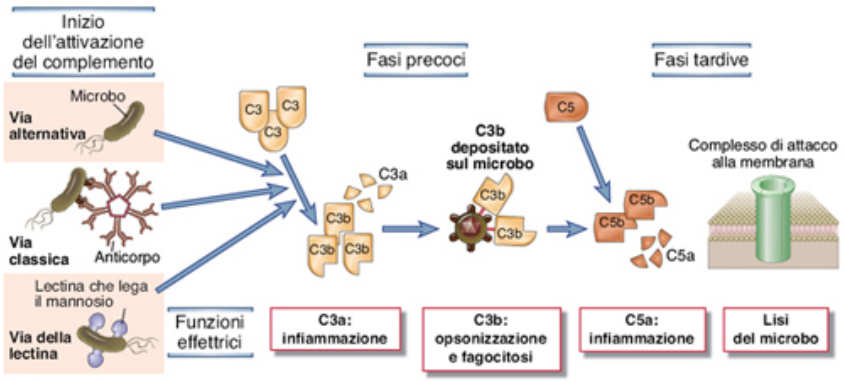


FIGURA 4-10 Vie di attivazione del complemento. L'attivazione del sistema del complemento può avvenire seguendo tre vie diverse, che portano tutte alla produzione di C3b (fasi precoci). C3b dà inizio alle fasi successive dell'attivazione del complemento, che culminano nella produzione di peptidi in grado di stimolare l'infiammazione (C5a) e la polimerizzazione di C9, il quale a sua volta forma il complesso di attacco alla membrana (così chiamato perché crea pori nella membrana plasmatica). Nella figura sono mostrate le principali funzioni delle più importanti proteine prodotte durante le diverse fasi. L'attivazione, le funzioni e la regolazione del sistema del complemento verranno discusse più dettagliatamente nel Capitolo 12.

La prima fase nell'attivazione del sistema del complemento è il riconoscimento di molecole sulle superfici microbiche, le quali sono però assenti sulle cellule dell'ospite. Ciò può avvenire in tre modi, ciascuno dei quali è identificato come una distinta via di attivazione del complemento.

- La **via classica**, così chiamata perché scoperta per prima, utilizza una proteina plasmatica, chiamata C1q, per identificare anticorpi legati alla superficie microbica o ad altre strutture (Fig. 4-10). Quando C1q si lega alla porzione Fc degli anticorpi, due serinproteasi a essa associate, dette C1r e C1s, si attivano e iniziano una cascata proteolitica. La via classica rappresenta uno dei principali meccanismi effettori del ramo umorale della risposta adattativa (vedi Cap. 13). Altre proteine solubili dell'immunità innata chiamate pentrassine, discusse più avanti, possono legare C1q e dare inizio alla via classica.
- La **via alternativa**, scoperta più tardi ma filogeneticamente più antica rispetto alla classica, inizia quando una proteina del complemento chiamata C3 riconosce direttamente determinate strutture microbiche di superficie, quali per esempio l'LPS batterico. Inoltre, C3 può attivarsi costitutivamente a bassi livelli, ma la sua deposizione sulle cellule self è inibita dalla presenza di proteine inibitorie. Dal

momento che, invece, i microbi non esprimono tali proteine, l'attivazione spontanea tende ad amplificarsi sulla loro superficie. In altre parole, la via alternativa distingue il self normale dai microbi basandosi sulla presenza o meno delle proteine inibitorie.

- La **via lectinica** viene iniziata da una proteina plasmatica detta *lectina legante il mannosio* (*Mannose-Binding Lectin*, MBL) che riconosce residui terminali di mannosio su glicoproteine e glicolipidi microbici, analogamente al recettore per il mannosio descritto in precedenza (Fig. 4-11). La MBL appartiene alla famiglia delle collectine (discusse più avanti) e possiede una struttura esamerica simile a quella descritta per C1q. In seguito al legame della MBL ai microbi, due zimogeni con funzione simile a C1r e C1s, detti MASP1 (*Mannose-Associated Serine Protease 1* o *Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Protease*) e MASP2, si associano a essa e iniziano una cascata proteolitica identica alla via classica.

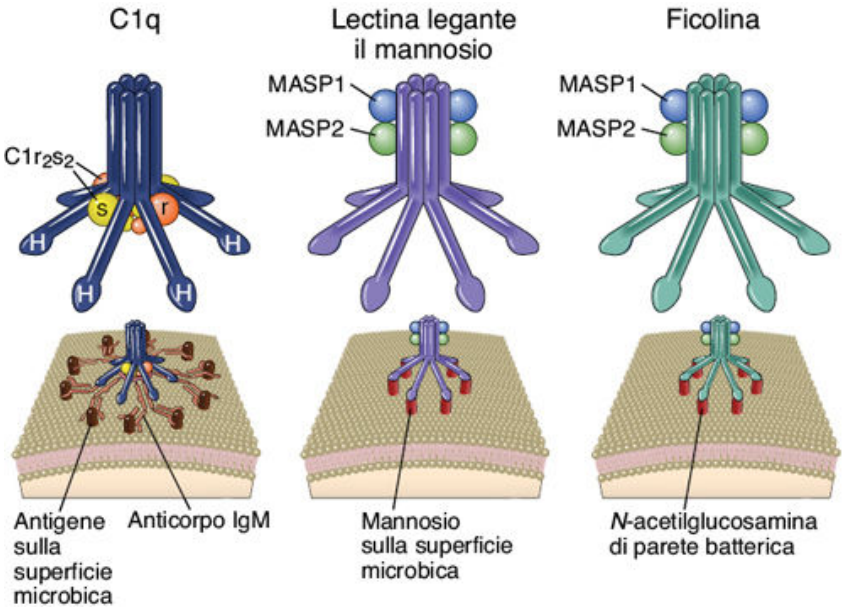


FIGURA 4-11 C1, lectina legante il mannosio e ficoline. Queste tre proteine esameriche dalla struttura simile sono tutte in grado di attivare il complemento riconoscendo i propri ligandi sulla superficie cellulare. Le teste globulari di tipo lectinico poste all'estremità dei filamenti collageno-simili di C1q e della lectina legante il mannosio riconoscono rispettivamente la regione Fc delle IgM e il mannosio sulle superfici microbiche. Le teste globulari fibrinogeno-simili della ficolina legano invece la *N*-acetilglucosamina. Il legame determina cambiamenti conformazionali che attivano l'attività serinproteasica di C1r e C1s (associate a C1q) e di MASP1 e MASP2 (associate alla lectina legante il mannosio e alla ficolina).

Il riconoscimento dei microbi da parte di una qualsiasi delle tre vie del complemento porta al reclutamento sequenziale e all'assemblaggio di ulteriori proteine del complemento per formare complessi ad attività proteasica (vedi Fig. 4-10). Uno di questi complessi, detto **C3 convertasi**, taglia la proteina centrale del sistema del **complemento C3** spezzandola nei frammenti C3a e C3b. Il frammento più grande C3b si lega covalentemente alla superficie microbica che aveva attivato la via del complemento. C3b funge da opsonina legandosi in modo covalente ai microbi e promuovendone la fagocitosi. Il frammento più piccolo, C3a, viene rilasciato e stimola l'infiammazione agendo come

fattore chemotattico per i neutrofili. Il frammento C3b lega altre proteine del complemento e forma un complesso proteasico chiamato **C5 convertasi**, che scinde la proteina C5 in un peptide (C5a) e in un frammento più grande (C5b) che resta legato alla membrana cellulare del microrganismo. Anche il frammento C5a possiede funzioni chemotattiche e induce cambiamenti nei vasi sanguigni che permettono la fuoriuscita di proteine e fluidi nei siti di infezione. Il frammento C5b innesca la formazione di un complesso di proteine costituito da C6, C7, C8 e C9, chiamato **complesso di attacco alla membrana (*Membrane Attack Complex*, MAC)**, che formano un poro sulla membrana plasmatica che causa la lisi delle cellule su cui è stato attivato il complemento.

Il sistema del complemento è una componente essenziale dell'immunità innata e i pazienti con deficienze di C3 sono altamente suscettibili a contrarre infezioni batteriche ricorrenti e spesso letali. Le alterazioni genetiche nella formazione del MAC determinano l'aumento della suscettibilità a un numero limitato di microbi, come per esempio *Neisseria* spp., che hanno pareti cellulari sottili particolarmente sensibili all'azione litica del MAC. Il sistema del complemento verrà discusso più nel dettaglio nel Capitolo 13.

Pentrassine

Molte proteine plasmatiche che riconoscono strutture microbiche e partecipano all'immunità innata appartengono alla famiglia delle pentrassine, un gruppo di proteine pentameriche strutturalmente omologo e filogeneticamente antico. Membri importanti di questa famiglia sono le pentrassine corte, quali la proteina C reattiva (PCR) e la sieroamiloide P (SAP), e la pentrassina lunga PTX3. Sia PCR sia SAP si legano a molte specie di funghi e batteri. I ligandi molecolari riconosciuti da PCR e da SAP comprendono rispettivamente la fosforilcolina e la fosfatidiletanolamina, che sono i prototipi dei fosfolipidi trovati sulle membrane batteriche e sulle cellule apoptotiche. PCR, SAP e PTX3 attivano tutte il complemento legandosi a C1q e iniziando la via classica.

Le concentrazioni plasmatiche di PCR sono molto basse negli individui sani, ma possono aumentare fino a 1.000 volte durante le infezioni e in risposta ad altri stimoli infiammatori. Gli aumentati livelli di PCR sono il risultato di un incremento della sintesi a livello epatico attivata dalle citochine IL-6 e IL-1, prodotte dai fagociti nell'ambito della risposta innata. L'IL-1 e l'IL-6 inducono la sintesi a livello epatico e l'aumento dei livelli plasmatici di SAP e di altre proteine non strettamente correlate alle pentrassine, che nel loro insieme sono chiamate **proteine di fase acuta**, poiché sono presenti a livelli elevati nel sangue in corso di reazioni infiammatorie.

PTX3 è prodotta da molti tipi cellulari, inclusi le cellule dendritiche, le cellule endoteliali e i macrofagi, in risposta ai ligandi dei TLR e alle citochine proinfiammatorie quali il TNF, ma non è una proteina di fase acuta. Viene anche accumulata nei granuli dei neutrofili e rilasciata quando i neutrofili muoiono. Essa riconosce diverse molecole espresse da funghi, batteri Gram-positivi e Gram-negativi, virus e cellule apoptotiche. Studi su animali knockout per PTX3 ne hanno evidenziato il ruolo protettivo nei confronti di alcuni di questi patogeni, per esempio il fungo *Aspergillus fumigatus*. PTX3 sembra inoltre contribuire alla risposta protettiva contro il virus dell'influenza.

Collectine e ficoline

Le **collectine** sono una famiglia di proteine trimeriche o esameriche. Ciascuna subunità contiene un dominio simile al collageno collegato tramite una regione colletto a un dominio lectinico che lega i carboidrati in modo calcio-dipendente (*C-type*). Tre membri di questa famiglia fungono da molecole effettrici solubili per il riconoscimento dei PAMP: la MBL e le proteine surfattanti (*Surfactant Proteins*, SP) polmonari SP-A e SP-D.

La **lectina legante il mannosio (*Mannose Bindig Lectin*, MBL)**, un PRR solubile che lega i carboidrati che presentano mannosi e fucosi terminali, è stata discussa in precedenza trattando la via lectinica di attivazione del complemento (vedi Fig. 4-11). Essa può anche funzionare da opsonina legandosi ai microbi e facilitandone la fagocitosi. Occorre ricordare che le opsonine si legano simultaneamente ai microbi e ai recettori sulla superficie dei fagociti: nel caso della MBL, tale recettore lega anche C1q ed è quindi detto recettore per C1q. Questo recettore è responsabile dell'internalizzazione dei microbi opsonizzati dalla MBL. Inoltre, la MBL è in grado di attivare il sistema del complemento, come menzionato precedentemente. Il gene che codifica la MBL è polimorfo e alcuni alleli sono associati a una ridotta formazione di esameri e bassi livelli ematici. Questa condizione è associata a una maggiore suscettibilità a varie infezioni, soprattutto se in combinazione con altre immunodeficienze.

SP-A (*Surfactant Protein A*) e **SP-D (*Surfactant Protein D*)** sono collectine con proprietà lipofiliche comuni ad altri surfattanti e si trovano negli alveoli polmonari. Le loro funzioni principali sono il mantenimento della capacità di espansione polmonare e le risposte immunitarie innate locali; si legano a vari microrganismi e fungono da opsonine, facilitando l'ingestione da parte dei macrofagi alveolari. SP-A e SP-D possono inibire direttamente la crescita batterica attraverso l'attivazione dei macrofagi. I topi privi di SP-A e SP-D hanno una ridotta capacità di resistere a infezioni polmonari.

Le **ficoline** sono proteine plasmatiche strutturalmente simili alle collectine, con un dominio collageno-simile, ma al posto del dominio lectinico hanno un dominio di riconoscimento dei carboidrati fibrinogeno-simile (vedi Fig. 4-11). Le ficoline legano e opsonizzano tipi batterici diversi e attivano il complemento in modo simile alla MBL. I ligandi molecolari delle ficoline includono la *N*-acetilglucosamina e l'acido lipoteicoico, componenti della parete dei batteri Gram-positivi.

Dopo aver descritto le proprietà generali e i diversi componenti dell'immunità innata, ovvero cellule, PRR cellulari e molecole solubili di riconoscimento ed effettrici, passeremo adesso a descrivere i meccanismi che l'immunità innata mette in campo per difendere l'organismo dai patogeni e che sono fondamentalmente tre: infiammazione, difese antivirali e attivazione della risposta adattativa.

RISPOSTA INFIAMMATORIA

Per combattere l'infezione e il danno tissutale l'immunità innata utilizza anzitutto l'infiammazione, grazie alla quale si ottiene l'accumulo di leucociti, proteine e fluidi di derivazione ematica nel tessuto infettato o danneggiato. I leucociti e le proteine plasmatiche circolano normalmente nel sangue ma possono essere reclutati nei tessuti infettati o danneggiati, dove contribuiscono all'eliminazione dei patogeni e alla riparazione del danno tissutale. I polimorfonucleati neutrofili rappresentano senza dubbio il tipo leucocitario più abbondante nei tessuti infiammati; tuttavia i monociti (che nel tessuto diventano macrofagi) possono prevalere nelle fasi più tardive o in alcuni particolari tipi di reazione. Le principali proteine che si accumulano nei siti infiammatori sono quelle del complemento, gli anticorpi e le proteine di fase acuta. L'afflusso di cellule e proteine nel sito infiammatorio dipende dai seguenti cambiamenti reversibili dei vasi sanguigni: 1) dilatazione arteriolare e conseguente aumento del flusso sanguigno, 2) aumentata adesività dei leucociti circolanti all'endotelio delle venule e 3) aumentata permeabilità dei capillari e delle venule. Questi cambiamenti sono provocati da citochine e da piccole molecole prodotte inizialmente da cellule residenti (quali mastociti, macrofagi e cellule endoteliali) in risposta alla stimolazione da parte dei PAMP o dei DAMP. Successivamente, tali mediatori possono derivare dai leucociti reclutati e attivati.

L'infiammazione acuta si sviluppa nell'arco di minuti oppure ore e persiste per alcuni giorni. Se l'infezione non viene eradicata, oppure se il danno tissutale permane a lungo, l'infiammazione evolve in *infiammazione cronica*, che consiste nel reclutamento e nell'attivazione di monociti e linfociti. I siti di infiammazione cronica vanno spesso incontro a fenomeni di rimodellamento tissutale e presentano angiogenesi e fibrosi. L'immunità innata ha un ruolo chiave nello sconfinamento verso l'infiammazione cronica: tuttavia anche l'immunità adattativa può esservi coinvolta, dato che le citochine prodotte dai linfociti T sono potenti induttori di infiammazione (vedi Cap. 10). Per una descrizione dettagliata dei diversi mediatori e delle manifestazioni patologiche dell'infiammazione acuta e cronica si rimanda ai testi di patologia. In questa sede ci focalizzeremo su alcuni aspetti dell'infiammazione acuta importanti sia per lo sviluppo della risposta immunitaria fisiologica sia per l'eziopatogenesi di malattie infiammatorie immunomediate.

Principali citochine proinfiammatorie: TNF, IL-1 e IL-6

La prima risposta dell'immunità innata all'infezione e al danno tissutale è la secrezione di citochine, evento cruciale per l'innesco della risposta infiammatoria acuta.
Le citochine dell'immunità innata hanno alcune importanti proprietà generali e funzioni (Tab. 4-4).

- Sono prodotte principalmente dai macrofagi tissutali e dalle cellule dendritiche, anche se possono essere prodotte da altri tipi di cellule, fra cui cellule endoteliali e cellule epiteliali.
- La maggioranza di queste citochine agisce su cellule vicine alla cellula produttrice (azione paracrina). Alcune gravi infezioni possono determinare una abnorme

produzione di citochine tale da farle entrare in circolo e agire a distanza (azione endocrina).

- Citochine diverse svolgono azioni simili o sovrapponibili, oppure sono uniche dal punto di vista funzionale. Una citochina può stimolare la produzione di altre, innescando cascate che amplificano la reazione o inducono nuove reazioni.
- Le citochine dell'immunità innata svolgono diverse funzioni: induzione dell'infiammazione, inibizione della replicazione virale, promozione delle risposte dei linfociti T e inibizione delle risposte immunitarie innate. Queste funzioni sono descritte di seguito e più avanti nel capitolo.

Tre delle più importanti citochine proinfiammatorie sono il TNF, l'IL-1 (che abbiamo già menzionato in diverse occasioni) e l'IL-6. Discuteremo ora le principali caratteristiche di queste citochine, focalizzandoci principalmente sul TNF e sull'IL-1, e successivamente descriveremo il loro ruolo nell'infiammazione acuta.

TABELLA 4-4 Citochine dell'immunità innata

Citochina	Dimensione	Principale fonte cellulare	Principali bersagli cellulari ed effetti biologici
Fattore di necrosi tumorale (*Tumor Necrosis Factor*, TNF)	17 kD; secreto come omotrimero di 51 kD	Macrofagi, linfociti T	Cellule endoteliali: attivazione (infiammazione, coagulazione) Neutrofili: attivazione Ipotalamo: febbre Fegato: sintesi delle proteine di fase acuta Muscolo, tessuto adiposo: catabolismo (cachessia) Molti tipi cellulari: apoptosi
Interleuchina-1 (IL-1)	Forma matura di 17 kD; precursore di 33 kD	Macrofagi, cellule endoteliali, alcune cellule epiteliali	Cellule endoteliali: attivazione (infiammazione, coagulazione) Ipotalamo: febbre Fegato: sintesi delle proteine di fase acuta Linfociti: differenziazione dei linfociti T_H17
Chemochine (vedi Tab. 3-2)	8-12 kD	Macrofagi, cellule endoteliali, linfociti T, fibroblasti, piastrine	Leucociti: chemotassi, attivazione, migrazione nei tessuti
Interleuchina-12 (IL-12)	Eterodimero formato da subunità di 35 kD e 40 kD	Macrofagi, cellule dendritiche	Linfociti T: differenziazione di linfociti T_H1 Cellule NK e linfociti

			T: sintesi di IFN-γ, aumento dell'attività citotossica
IFN di tipo I (IFN-α, IFN-β)	IFN-α: 15-21 kD IFN-β: 20-25 kD	IFN-α: macrofagi, cellule dendrtiiche plasmacitoidi IFN-β: fibroblasti	Tutti i tipi cellulari: stato antivirale, aumento dell'espressione di molecole MHC di classe I Cellule NK: attivazione
Interleuchina-10 (IL-10)	Omodimero di 34-40 kD; subunità di 18 kD	Macrofagi, linfociti T (principalmente linfociti T regolatori)	Macrofagi, cellule dendritiche: inibizione della produzione di IL-12 e dell'espressione di molecole costimolatorie e di molecole MHC di classe II
Interleuchina-6 (IL-6)	19-26 kD	Macrofagi, cellule endoteliali, linfociti T	Fegato: sintesi delle proteine di fase acuta Linfociti B: proliferazione delle cellule che producono anticorpi Linfociti T: differenziazione di linfociti T_H17
Interleuchina-15 (IL-15)	13 kD	Macrofagi, altre cellule	Cellule NK: proliferazione Linfociti T: proliferazione (linfociti $CD8^+$ della memoria)
Interleuchina-18 (IL-18)	17 kD	Macrofagi	Cellule NK e linfociti T: sintesi di IFN-γ
Interleuchina-23 (IL-23)	Eterodimero formato da subunità di 19 kD e 40 kD (comune a IL-12)	Macrofagi e cellule dendritiche	Linfociti T: mantenimento di linfociti T_H17
Interleuchina-27 (IL-27)	Eterodimero formato da subunità di 28 kD e 13 kD	Macrofagi e cellule dendritiche	Linfociti T: differenziazione di linfociti TH1, inibizione di linfociti T_H17 Cellule NK: sintesi di IFN-γ

Fattore di necrosi tumorale

Il fattore di necrosi tumorale (TNF) è un mediatore della risposta infiammatoria acuta a batteri e ad altri patogeni. Questa citochina venne originariamente identificata come

una sostanza presente nel siero (fattore) in grado di causare la necrosi dei tumori e a questo deve il suo nome. Attualmente si sa che tale azione dipende dall'infiammazione e dalla trombosi dei vasi ematici tumorali. Il TNF viene anche chiamato TNF-α per distinguerlo dal TNF-β, detto anche *linfotossina*, a esso strettamente correlato. Il TNF è prodotto da macrofagi, cellule dendritiche e altri tipi cellulari. Nei macrofagi viene sintetizzato come proteina di membrana di tipo II non glicosilata ed espresso come omotrimero in grado di legare un tipo di recettore del TNF. Il clivaggio di questa forma di membrana, a opera di una metalloproteinasi anch'essa associata alla membrana, determina il rilascio di un frammento polipeptidico: tre di questi frammenti polimerizzano a formare una proteina a piramide triangolare che rappresenta il TNF circolante (Fig. 4-12). I siti di legame al recettore si trovano alla base della piramide e permettono così alla citochina di legare simultaneamente tre molecole recettoriali.

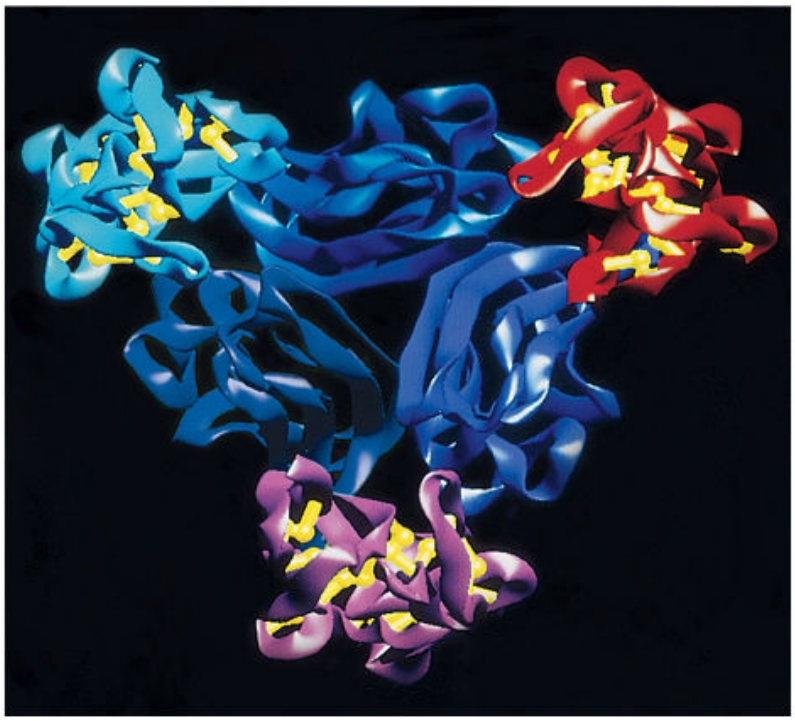


FIGURA 4-12 Struttura del complesso linfotossina-recettore per il TNF. La struttura a nastro, ricavata mediante cristallografia a raggi X, mostra una visione dall'alto del complesso costituito da tre recettori per il TNF (TNF-RI) e una molecola di linfotossina. Quest'ultima è un omotrimero (le sue tre subunità sono qui colorate in *blu*) che forma una piramide a tre lati invertita con la base in alto e l'apice in basso. Ciascuna delle tre molecole di TNF-RI (colorate in *violetto*, *azzurro* e *rosso*) interagisce contemporaneamente con due diversi monomeri di linfotossina. I ponti disolfuro dei recettori sono colorati in *giallo*. Il TNF è strutturalmente omologo alla linfotossina e potrebbe legarsi al suo recettore in modo simile. (*Da Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, Lesslauer W: Cell: crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor–human TNFβ complex: implications for TNF receptor activation, Cell 73:431–445, 1993.*)

Esistono due distinti recettori per il TNF detti di tipo I (TNF-RI) e di tipo II (TNF-RII). L'affinità del TNF per i suoi recettori è insolitamente bassa per una citochina, con una costante di dissociazione (K_d) compresa tra $\sim 1 \times 10^{-9}$ M per TNF-RI e $\sim 5 \times 10^{-10}$ M per

TNF-RII. Entrambi i recettori sono espressi sulla superficie di quasi tutti i tipi cellulari e fanno parte di una grande famiglia di proteine, chiamata *superfamiglia dei recettori del TNF*, molte delle quali sono coinvolte nelle risposte immunitarie e infiammatorie. Tutti questi recettori sono espressi sulla membrana citoplasmatica come trimeri. L'interazione del ligando con alcuni membri della famiglia dei recettori del TNF (quali TNF-RI, TNF-RII e CD40) determina l'associazione della porzione citoplasmatica del recettore con proteine definite TRAF (*TNF Receptor-Associated Factors*). A loro volta, queste proteine inducono l'attivazione di fattori di trascrizione come NF-κB e AP-1. L'interazione del TNF con altri recettori membri della famiglia, come per esempio il TNF-RI, può anche reclutare una proteina adattatrice che attiva le caspasi e innesca l'apoptosi. Quindi, i diversi membri della famiglia dei recettori del TNF possono indurre trascrizione genica, apoptosi o entrambi i processi.

La produzione di TNF è stimolata da un grande numero di PAMP e DAMP. L'attivazione dei TLR, NLR e RLR può indurre l'espressione genica del TNF, in parte attraverso l'attivazione del fattore trascrizionale NF-κB. Elevate quantità di questa citochina possono essere prodotte in corso di infezione da batteri Gram-negativi e Gram-positivi, che esprimono i ligandi dei TLR, quali LPS e acido lipoteicoico, rispettivamente, e possono rilasciare tali molecole dalle proprie pareti cellulari. Lo shock settico, condizione potenzialmente letale causata dall'ingresso dei batteri nel torrente circolatorio, è mediata in larga parte dal TNF. Discuteremo lo shock settico più avanti nel corso di questo capitolo.

Interleuchina-1

Anche l'IL-1 è un mediatore della risposta infiammatoria acuta e condivide con il TNF molte funzioni. La principale fonte cellulare di IL-1, come di TNF, sono i fagociti mononucleati attivati. A differenza del TNF, però, l'IL-1 viene prodotta anche da molti altri tipi cellulari quali neutrofili, cellule epiteliali (come i cheratinociti) e cellule endoteliali. Esistono due forme di IL-1, denominate IL-1α e IL-1β, che legano gli stessi recettori e condividono le stesse attività biologiche nonostante presentino un'omologia inferiore al 30%. La principale forma secreta e biologicamente attiva è l'IL-1β.

La produzione di IL-1 richiede normalmente due segnali distinti: il primo per attivare la trascrizione genica della pro-IL-1β, precursore polipeptidico di 33 kD, e il secondo per attivare l'inflammasoma, il quale a sua volta taglia proteoliticamente il precursore generando la forma matura di 17 kD di IL-1β (vedi Fig. 4-4). Come abbiamo già discusso, la trascrizione genica dell'IL-1β è indotta dalla cascata di trasduzione del segnale dei recettori TLR e NLR, che attiva NF-κB, mentre il taglio della pro-IL-1β viene effettuato dall'inflammasoma NLRP3. L'IL-1 viene secreta attraverso una via definita non classica, dal momento che, contrariamente a quanto avviene per la maggior parte delle proteine secrete, né l'IL-1α né l'IL-1β posseggono una sequenza segnale idrofobica in grado di condurre il polipeptide nascente verso la membrana del reticolo endoplasmatico. È possibile che l'IL-1 matura venga rilasciata per lo più quando le cellule infettate o i macrofagi attivati muoiono. Alcuni batteri patogeni inducono sia il processamento dell'IL-

1β e dell'IL-18, da parte dall'inflammasoma, sia un tipo di morte cellulare attivata dalla caspasi-1 o dalla caspasi-11 detta piroptosi, già trattata in precedenza. Anche il TNF stimola la produzione di IL-1 da parte di macrofagi e altri tipi cellulari: questo rappresenta un esempio di cascata di citochine che condividono molte attività biologiche.

L'IL-1 induce i suoi effetti biologici interagendo con un recettore di membrana detto *recettore di tipo I* espresso da molti tipi cellulari, tra cui cellule endoteliali, cellule epiteliali e leucociti. Questo recettore è una proteina integrale di membrana contenente un dominio immunoglobulinico extracellulare che lega l'IL-1 e un dominio nella regione citoplasmatica detto TIR, responsabile della trasduzione del segnale e precedentemente descritto durante la trattazione dei TLR. Gli eventi di attivazione intracellulare che susseguono al legame dell'IL-1 al recettore di tipo I sono simili a quelli descritti per i TLR e determinano l'attivazione dei fattori trascrizionali NF-κB e AP-1 (vedi Cap. 7). Il recettore per l'IL-1 di tipo II non è invece in grado di attivare alcuna cascata di trasduzione del segnale intracellulare.

Interleuchina-6

L'IL-6 è un'altra importante citochina nelle risposte infiammatorie acute con effetti sia locali sia sistemici. Induce la sintesi di una varietà di altri mediatori infiammatori a livello epatico, stimola la produzione di neutrofili nel midollo osseo e promuove la differenziazione di linfociti T helper in cellule che producono l'IL-17. L'IL-6 viene sintetizzata da fagociti mononucleati, cellule dell'endotelio vascolare, fibroblasti e altre cellule in risposta a PAMP, IL-1 e TNF. L'IL-6 è un omodimero appartenente alla famiglia delle citochine di tipo I (vedi Cap. 7). Il recettore per l'IL-6 consiste in una catena polipeptidica che lega la citochina e in una subunità che trasduce il segnale (chiamata gp130), la quale rappresenta anche il componente attivatorio dei recettori per altre citochine. Il recettore dell'IL-6 innesca una cascata di trasduzione intracellulare che porta all'attivazione del fattore trascrizionale STAT3 (vedi Cap. 7).

Altre citochine prodotte in corso di risposta immunitaria innata

Oltre al TNF, all'IL-1 e all'IL-6, le cellule dendritiche e i macrofagi attivati dai PAMP e dai DAMP producono altre citochine che svolgono ruoli importanti nelle risposte immunitarie innate (vedi Tab. 4-4). In questa sezione tratteremo le principali caratteristiche di alcune di queste citochine e il rispettivo ruolo svolto nell'immunità innata; gli interferoni e le citochine inibitorie verranno trattate più avanti in questo capitolo.

IL-12 è secreta dalle cellule dendritiche e dai macrofagi e stimola la produzione di IFN-γ da parte delle cellule NK e dei linfociti T, promuove la citotossicità dei linfociti CD8 e CD8$^+$ delle cellule NK e la differenziazione delle cellule T_H1. IL-12 è un eterodimero, formato da due subunità di 35-kD (p35) e 40-kD (p40), legate da ponti disolfuro. La subunità p35 è un membro della famiglia delle citochine di tipo I, mentre la subunità p40 è anche un componente della citochina IL-23, che è coinvolta nella

differenziazione dei linfociti T_H17. Pertanto, gli anticorpi specifici per p40 bloccano sia IL-12 sia IL-23 e inibiscono l'azione di IL-12 sulla differenziazione dei linfociti T_H1 e di IL-23 sui linfociti T_H17. Questi anticorpi sono approvati per il trattamento di malattie infiammatorie dell'intestino e della psoriasi, entrambe causate dalle citochine T_H1 e/o T_H17.

La principale fonte di IL-12 è costituita dalle cellule dendritiche attivate e dai macrofagi. Numerose cellule sembrano essere in grado di sintetizzare la subunità p35, ma i macrofagi e le cellule dendritiche sono i principali tipi cellulari che producono la proteina p40 e, pertanto, la citochina biologicamente attiva. Durante le reazioni immunitarie innate ai microbi, IL-12 è prodotta in risposta al legame tra TLR e stimoli microbici quali LPS, acido lipoteicoico e nelle infezioni virali. IFN-γ, prodotto dalle cellule NK e linfociti T, stimola la produzione di IL-12, contribuendo a un feedback positivo.

Il recettore per IL-12 (IL-12R) è un eterodimero composto dalle subunità β1 e β2, entrambe le quali sono membri della famiglia di recettori delle citochine di tipo I. Entrambe le catene sono necessarie per il legame ad alta affinità dell'Il-12 e per la trasduzione del segnale, che porta all'attivazione del fattore di trascrizione STAT4. L'espressione della catena β2 del recettore di IL-12 è indotta da IFN-γ, la cui produzione è stimolata dall'IL-12. Questo è un altro esempio di amplificazione positiva nelle risposte immunitarie. Studi condotti su topi knockout e sul fenotipo di rari pazienti con mutazioni nel gene che codifica per il recettore dell'IL-12 indicano che IL-12 è importante per la produzione di IFN-γ da parte delle cellule NK e dei linfociti T e per la resistenza dell'ospite ai batteri intracellulari e ad alcuni virus. Per esempio è stato descritto che pazienti con mutazioni nella subunità β1 del recettore dell'IL-12 sono altamente sensibili a infezioni da parte di batteri intracellulari, e più precisamente *Salmonella* e micobatteri atipici. IL-12 secreta dalle cellule dendritiche durante la presentazione dell'antigene ai linfociti T $CD4^+$ naïve promuove la loro differenziazione in cellule T_H1, che sono importanti per la difesa dalle infezioni intracellulari (vedi Cap. 10). Questo è un meccanismo fondamentale con cui l'immunità innata plasma le risposte immunitarie adattative.

IL-18 attiva le funzioni delle cellule NK, analogamente a IL-12. Ricordiamo che la produzione di IL-18, come quella di IL-1, dipende dall'inflammasoma. Inoltre, analogamente all'IL-1, l'IL-18 si lega a un recettore che trasduce segnali attraverso un dominio TIR.

IL-15 svolge importanti funzioni di stimolazione della crescita e sopravvivenza delle le cellule NK e dei linfociti T. IL-15 è strutturalmente omologa al fattore di crescita dei linfociti T IL-2, e il recettore eterotrimerico dell'IL-15 condivide due subunità con il recettore dell'IL-2. Una caratteristica interessante dell'IL-15 è che può essere espressa sulla superficie cellulare legata alla catena α del suo recettore e, in questa forma, può essere presentata alle cellule limitrofe che esprimono un recettore composto dalle altre due catene (β e γ). L'IL-15 presentata in tal modo dalle cellule dendritiche alle cellule NK

promuove la produzione di IFN-γ da parte delle cellule NK nei linfonodi. L'IL-15 funge inoltre da fattore di sopravvivenza per le cellule NK e i linfociti T $CD8^+$ della memoria.

IL-25 e IL-33 sono citochine strutturalmente non correlate che stimolano le ILC del Gruppo 2, le cellule T_H2 e i mastociti a produrre IL-4, IL-5 e IL-13, citochine importanti per la difesa verso gli elminti, ma che contribuiscono anche alla patogenesi delle malattie allergiche.

Reclutamento dei leucociti nei focolai infettivi

Durante l'infiammazione acuta un elevato numero di neutrofili e successivamente anche di monociti abbandona il torrente ematico per accumularsi nei tessuti. TNF, IL-1 e IL-6 e le chemochine, prodotte nei siti di infezione o di danno tissutale, hanno molteplici effetti sull'endotelio vascolare, sui leucociti e sul midollo osseo, con il conseguente richiamo a livello locale di cellule che combattono l'infezione e riparano i tessuti (vedi Fig. 3-3). Il reclutamento leucocitario è stato descritto nel Capitolo 3 e dunque verrà qui solo brevemente considerato.

Sia il TNF che l'IL-1 inducono l'espressione di E-selectina e aumentano quella di ICAM-1 e VCAM-1, i ligandi delle integrine leucocitarie espressi dall'endotelio delle venule postcapillari. Questi cambiamenti sono il risultato dell'attivazione di fattori trascrizionali, come NF-κB, che attivano la trascrizione dei geni per queste molecole. Anche l'espressione di P-selectina risulta aumentata, ma ciò è in larga parte dovuto all'azione dell'istamina e della trombina, che stimolano la rapida mobilizzazione verso la superficie cellulare della P-selectina che normalmente è conservata all'interno dei granuli delle cellule endoteliali.

Il TNF e l'IL-1 stimolano anche diversi tipi cellulari a produrre chemochine quali CXCL1 e CCL2 che, legando i rispettivi recettori su neutrofili e monociti, stimolano il movimento direzionale dei leucociti e aumentano l'affinità delle integrine leucocitarie per i propri ligandi. Il risultato dell'aumentata espressione di selectine, integrine e chemochine è l'aumento dell'adesione di neutrofili e monociti alle cellule endoteliali e la loro trasmigrazione attraverso la parete dei vasi. I leucociti si accumulano nei tessuti, formando l'infiltrato infiammatorio. Le azioni del TNF sull'endotelio e sui leucociti sono fondamentali per sviluppare un'adeguata risposta locale ai microbi. Infatti, insufficienti quantità di TNF possono determinare il fallimento dell'azione di contenimento delle infezioni, come avviene per esempio in pazienti trattati con farmaci che bloccano il TNF o in topi knockout per TNF.

Infine il TNF, l'IL-1 e l'IL-6 prodotti nei siti infiammatori possono entrare in circolo ed essere trasportati al midollo osseo, dove incrementano la produzione di neutrofili a partire da progenitori midollari, normalmente agendo in concerto con i fattori di stimolazione delle colonie (*Colony-Stimulating Factors*, CSF). In questo modo, le citochine proinfiammatorie aumentano la disponibilità di cellule infiammatorie che possono essere reclutate ai siti di infezione.

Ingestione e uccisione dei microbi da parte delle cellule fagocitiche attivate

I neutrofili e i macrofagi reclutati nei siti di infezione inglobano i microbi all'interno di vescicole attraverso il processo della fagocitosi e successivamente li eliminano (Fig. 4-13). La fagocitosi è un processo attivo che comporta consumo energetico e permette di inglobare grosse particelle (di diametro >0,5 μm) all'interno di vescicole. Le vescicole fagocitiche si fondono con i lisosomi, dove le particelle ingerite vengono degradate: in questo modo i meccanismi di uccisione, che sarebbero potenzialmente in grado di danneggiare il fagocita stesso, rimangono isolati dal resto della cellula.

I neutrofili e i macrofagi esprimono recettori in grado di riconoscere in modo specifico i microbi e il legame dei microbi a tali recettori rappresenta l'inizio del processo di fagocitosi. Alcuni di questi recettori sono PRR, come le lectine di tipo C e i recettori scavenger di cui abbiamo già parlato. I PRR contribuiscono esclusivamente alla fagocitosi dei microrganismi che esprimono particolari profili molecolari, come il mannosio nel caso del recettore omonimo. I fagociti esprimono anche recettori ad alta affinità per alcune opsonine come gli anticorpi, le proteine del complemento e le lectine plasmatiche; questi recettori sono fondamentali per la fagocitosi dei microbi opsonizzati. Gli anticorpi rappresentano una delle opsonine più efficienti. I fagociti esprimono FcγRI, un recettore ad alta affinità per il frammento Fc delle IgG (vedi Cap. 13). Pertanto, nel corso di un'infezione che comporta la produzione di IgG, queste ultime, legate all'antigene, vengono riconosciute attraverso i recettori FcγRI espressi dai fagociti; questo riconoscimento promuove la fagocitosi dei microbi. La fagocitosi anticorpo-dipendente illustra un collegamento tra l'immunità innata e quella adattativa: gli anticorpi sono un prodotto dell'immunità adattativa (dei linfociti B) che utilizza cellule effettrici dell'immunità innata (i fagociti) per svolgere la propria funzione protettiva.

Non appena un microbo o un suo frammento si legano a un recettore fagocitico, la regione della membrana plasmatica in cui si trova il recettore comincia a riarrangiarsi per formare una protrusione a forma di coppa che si espanderà sino a raggiungere le dimensioni necessarie a racchiudere la particella e a richiudersi, formando una vescicola intracellulare (Fig. 4-13). A questo punto la vescicola, detta *fagosoma*, che contiene la particella estranea, si distacca dalla membrana plasmatica. I recettori di membrana che riconoscono il patogeno inviano anche segnali di attivazione che stimolano le attività microbicide dei fagociti. Come vedremo qui di seguito, i microrganismi fagocitati vengono uccisi e allo stesso tempo, a partire dalle proteine microbiche, vengono generati peptidi che sono presentati ai linfociti T per dare inizio alle risposte dell'immunità specifica (vedi Cap. 6).

I neutrofili e i macrofagi attivati uccidono i microrganismi fagocitati attraverso la produzione di molecole microbicide nei fagolisosomi (Fig. 4-13). I segnali provenienti da vari recettori, tra cui i PRR, i recettori per opsonine (come recettori per Fc e C3), e i recettori per le citochine (principalmente l'IFN-γ) collaborano per attivare i fagociti a uccidere i microbi ingeriti. La fusione dei fagosomi con i lisosomi porta alla formazione dei fagolisosomi, in cui si concentra la maggior parte dei meccanismi microbicidi. Le tre principali molecole microbicide sono descritte qui di seguito.

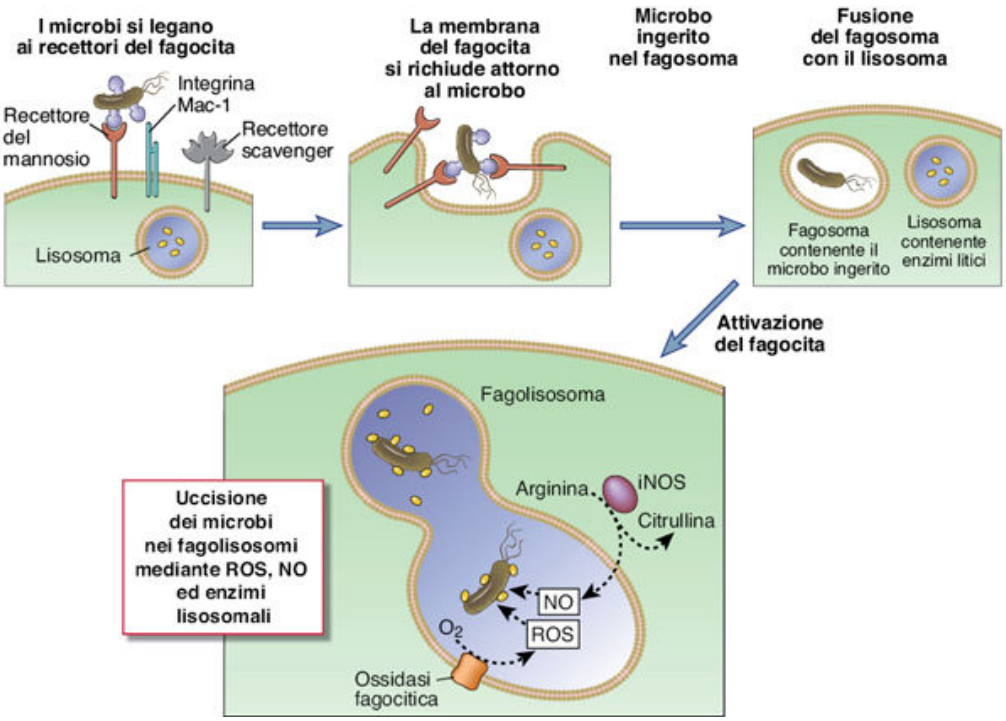


FIGURA 4-13 Fagocitosi e uccisione intracellulare dei microbi. I microbi possono essere ingeriti attraverso diversi recettori presenti sulla membrana dei fagociti; alcuni legano direttamente i microbi, altri legano solo microbi opsonizzati. (Si noti che l'integrina Mac-1 si lega ai microbi opsonizzati da proteine del complemento, non mostrato in figura.) I microbi vengono internalizzati nei fagosomi, che si fondono con i lisosomi a formare i fagolisosomi in cui i microrganismi sono uccisi dalle specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) e dell'azoto, e dagli enzimi proteolitici. iNOS, sintasi inducibile del monossido di azoto; NO, monossido di azoto.

- ***Specie reattive dell'ossigeno***. I macrofagi e i neutrofili attivati convertono l'ossigeno molecolare in specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS), agenti ossidanti ad alta reattività che distruggono i microbi (e altre cellule). Il principale sistema per generare radicali liberi è quello dell'ossidasi fagocitica, un enzima costituito da multiple subunità che si assemblano a livello della membrana del fagolisosoma nei fagociti attivati. L'ossidasi fagocitica (NADPH ossidasi) è attivata da molti stimoli, tra cui l'IFN-γ e gli attivatori dei TLR. La sua funzione è ridurre l'ossigeno molecolare in ROS, quali i radicali superossido, utilizzando come cofattore la forma ridotta della nicotinamide adenindinucleotide fosfato (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide PHosphate*, NADPH). Il superossido viene poi enzimaticamente dismutato in perossido di idrogeno, usato dall'enzima mieloperossidasi per convertire composti alogeni, normalmente non reattivi, in acidi ipoalogenati tossici. Il processo con cui vengono prodotti ROS è chiamato **burst (esplosione) respiratorio** poiché avviene grazie al consumo di ossigeno (respirazione cellulare). Sebbene la generazione di ROS sia generalmente considerata la funzione principale dell'ossidasi fagocitica, questo enzima svolge anche la funzione di produrre all'interno delle vescicole fagocitiche le condizioni adatte affinché gli enzimi proteolitici possano svolgere la loro azione. Funzionando come una pompa elettronica, l'ossidasi genera un gradiente elettrochimico e un movimento

di ioni all'interno del vacuolo, che portano alla diminuzione del pH e dell'osmolarità, condizioni necessarie per l'attivazione dell'elastasi e della catepsina G. La **malattia granulomatosa cronica** è una sindrome causata dal deficit ereditario di una delle componenti dell'ossidasi fagocitica; questo deficit compromette la capacità dei neutrofili di uccidere i batteri Gram-positivi (vedi Cap. 21).

- ***Monossido di azoto (NO)***. Oltre ai ROS, i macrofagi producono specie reattive dell'azoto, in particolare NO, per azione di un enzima detto *sintasi inducibile del monossido di azoto* (*inducible Nitric Oxide Synthase*, iNOS). L'iNOS è un enzima citoplasmatico assente nei macrofagi quiescenti ma che viene indotto in risposta a prodotti microbici che attivano i TLR, specialmente in combinazione con IFN-γ. L'iNOS catalizza la conversione dell'arginina a citrullina, con rilascio di NO, gas liberamente diffusibile. All'interno dei fagolisosomi, l'NO può combinarsi con il perossido o il superossido di idrogeno, generati dall'ossidasi fagocitica, per produrre il perossinitrito, un radicale altamente reattivo in grado di uccidere i microbi. La funzione cooperativa e ridondante dei ROS e dell'NO è dimostrata dalla scoperta che topi knockout per l'iNOS e per l'ossidasi fagocitica sono più suscettibili alle infezioni batteriche rispetto agli animali knockout carenti di uno solo dei due enzimi.
- ***Enzimi proteolitici***. All'interno dei fagolisosomi dei neutrofili e dei macrofagi attivati si trovano molti tipi di enzimi proteolitici. Nei neutrofili, uno dei più importanti è l'elastasi, una serinproteasi ad ampio spettro, necessaria per l'uccisione di molte specie batteriche. Un altro enzima importante è la catepsina G. Studi in topi knockout hanno confermato che questi enzimi sono indispensabili affinché la cellula fagocitica riesca a uccidere i batteri.

I neutrofili uccidono i microbi anche con estrusione del DNA e del contenuto dei granuli, che formano dei filamenti extracellulari sui quali i batteri e i funghi sono intrappolati e uccisi. Il contenuto estruso, noto anche come **trappola extracellulare o NET *(Neutrophil Extracellular Traps***) è composto da filamenti di DNA e istoni, ai quali sono legate elevate concentrazioni delle molecole antimicrobiche contenute nei granuli, fra cui lisozima, elastasi e defensine. Le NET si formano quando i neutrofili si legano alla matrice tissutale mediante l'integrina Mac-1 e sono attivati dai prodotti microbici. L'estrusione del contenuto nucleare in corso di formazione dei NET porta alla morte dei neutrofili.

Altre funzioni dei macrofagi attivati

Oltre alla capacità di uccidere i microbi fagocitati, i macrofagi svolgono numerose funzioni nella difesa contro le infezioni (Fig. 4-14). Molte di queste sono dovute alle citochine da essi prodotte. Abbiamo già visto come il TNF, l'IL-1 e le chemochine secrete dai fagociti potenzino le reazioni infiammatorie ai microrganismi e determinino l'accumulo di leucociti e proteine plasmatiche. I macrofagi attivati producono anche fattori di crescita per fibroblasti e cellule endoteliali che partecipano al rimodellamento dei

tessuti danneggiati dall'infezione. Il ruolo dei macrofagi nell'immunità cellulare è descritto nel Capitolo 10.

I macrofagi possono essere attivati in diversi modi, che favoriscono le funzioni microbicide e proinfiammatorie o, viceversa, le funzioni anti-infiammatorie e di riparo dei tessuti. Questi diversi tipi di attivazione macrofagica, definiti rispettivamente classico e alternativo, sono trattati in maggior dettaglio nel Capitolo 10.

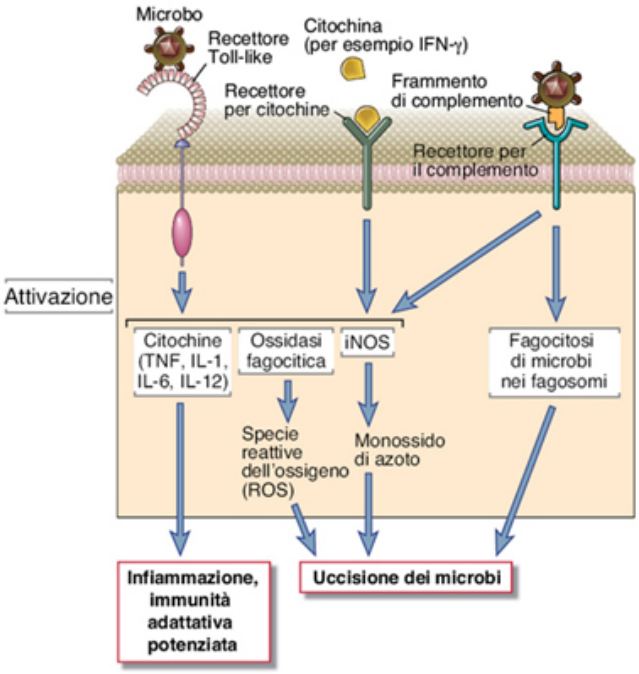


FIGURA 4-14 Funzioni dei macrofagi. I macrofagi sono attivati da prodotti microbici, come l'LPS, e dall'IFN-γ prodotto dalle cellule NK. Il processo di attivazione dei macrofagi porta all'attivazione dei fattori di trascrizione, alla trascrizione di vari geni e alla sintesi di proteine che mediano le funzioni di queste cellule. Nell'immunità cellulare specifica, i macrofagi sono attivati essenzialmente nello stesso modo da stimoli prodotti dai linfociti T (ligando di CD40 e IFN-γ) (vedi Fig. 10-7). I macrofagi possono inoltre essere attivati da altri segnali che promuovono la riparazione tissutale e la fibrosi (non mostrato in figura).

Effetti sistemici e patologici dell'infiammazione

Le citochine proinfiammatorie svolgono anche effetti sistemici che contribuiscono alla difesa dell'ospite e sono responsabili di molte delle manifestazioni cliniche dell'infezione e dell'infiammazione (Fig. 4-15).

- ***Il TNF, l'IL-1 e l'IL-6 agiscono sull'ipotalamo per indurre un aumento della temperatura corporea (febbre)*** e sono perciò chiamati pirogeni endogeni, ovvero agenti febbrili prodotti dall'ospite, per distinguerli dai pirogeni di derivazione microbica (esogeni), come per esempio l'LPS. Questa distinzione ha ormai un significato più che altro storico: infatti oggi sappiamo che l'LPS provoca la febbre attraverso la produzione di citochine proinfiammatorie. Il TNF e l'IL-1 inducono febbre attraverso l'aumento della sintesi di prostaglandine nelle cellule ipotalamiche.

Gli inibitori della sintesi delle prostaglandine, come l'acido acetilsalicilico, riducono la febbre bloccando l'azione di queste citochine. Il ruolo dall'innalzamento della temperatura corporea nella difesa dell'ospite non è stato completamente chiarito, ma potrebbe essere correlato all'aumento del metabolismo delle cellule del sistema immunitario, alla diminuzione di quello microbico e a modificazioni nel comportamento dell'ospite che riducono i rischi di peggiorare l'infezione e il danno.

- ***L'IL-1 e l'IL-6 inducono gli epatociti a produrre e immettere in circolo proteine di fase acuta quali PCR, SAP e fibrinogeno.*** Nella pratica clinica, i livelli elevati di proteine di fase acuta sono considerati segnali di infezione o, più in generale, della presenza di processi infiammatori. Come descritto precedentemente, le pentrassine PCR e SAP svolgono un ruolo protettivo nelle infezioni, mentre il fibrinogeno, precursore della fibrina, contribuisce all'emostasi e alla riparazione tissutale.

Nelle infezioni gravi, il TNF può essere prodotto in grandi quantità e determinare anomalie sistemiche. Se lo stimolo è sufficientemente forte, la quantità di TNF rilasciata può essere tale da entrare in circolo (Fig. 4-15). Le principali azioni sistemiche del TNF sono le seguenti.

- Il TNF inibisce la contrattilità del miocardio e il tono della muscolatura dei vasi, causando caduta della pressione arteriosa e shock.
- Può causare trombosi intravascolare principalmente determinando una compromissione delle normali proprietà anticoagulanti delle superfici endoteliali. In effetti, il TNF stimola in queste cellule la sintesi del *fattore tissutale*, un potente attivatore della coagulazione. Contemporaneamente, il TNF inibisce l'espressione della *trombomodulina*, un potente inibitore del processo di coagulazione. Queste alterazioni sono accentuate dalla concomitante attivazione dei neutrofili che causano l'ostruzione dei capillari. La capacità del TNF di causare necrosi tumorale (che, ricordiamo, è alla base del suo nome) è in effetti principalmente dovuta all'esteso danno prodotto a livello della microvascolatura tumorale.
- La persistente produzione di TNF causa un imponente danno del tessuto muscolare e adiposo definito *cachessia*. Tale fenomeno, caratterizzato a livello clinico da un pronunciato deperimento fisico, è causato principalmente dalla soppressione dell'appetito. Inoltre, il TNF è in grado di inibire la sintesi della *lipoprotein lipasi*, un enzima necessario per la liberazione di acidi grassi dalle lipoproteine circolanti e per il loro utilizzo da parte dei tessuti.

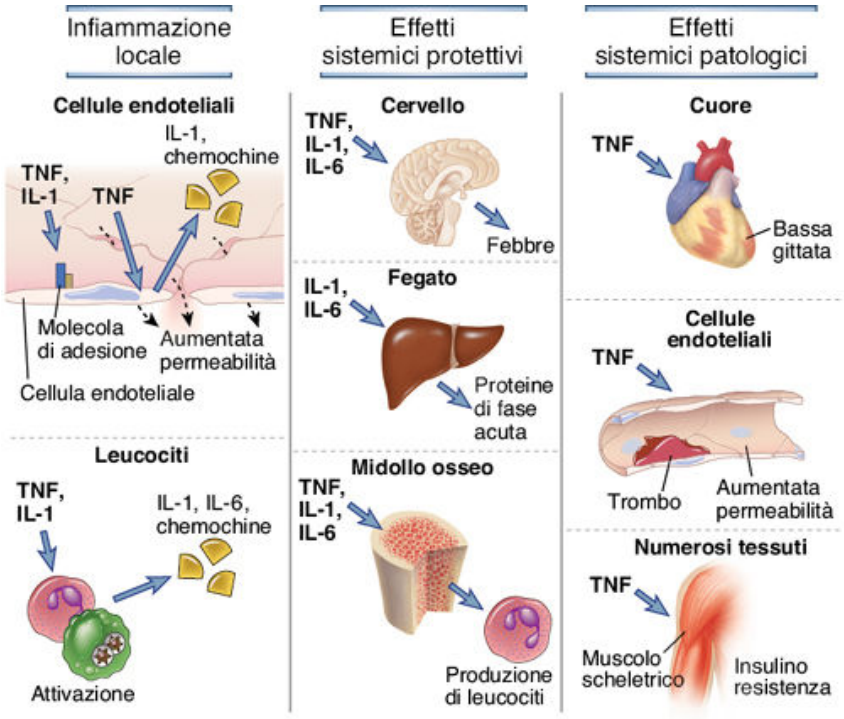


FIGURA 4-15 Effetti locali e sistemici delle citochine proinfiammatorie. Il TNF, l'IL-1 e l'IL-6 mediano molti effetti infiammatori sia locali sia sistemici. Il TNF e l'IL-1 agiscono sui leucociti e sull'endotelio per attivare l'infiammazione acuta e il rilascio di IL-6 da parte di leucociti e altri tipi cellulari. Il TNF, l'IL-1 e l'IL-6 sono responsabili degli effetti sistemici dell'infiammazione, ovvero febbre, sintesi di proteine di fase acuta da parte del fegato e produzione di leucociti da parte del midollo osseo. Il TNF sistemico può essere responsabile delle alterazioni funzionali che conducono allo shock settico, come per esempio diminuzione della funzione cardiaca, trombosi, aumentata permeabilità capillare e alterazioni metaboliche dovute alla resistenza all'insulina.

Una sindrome definita **shock settico**, causata dall'LPS dei batteri Gram-negativi (shock endotossico) oppure dall'acido lipoteicoico rilasciato dai batteri Gram-positivi, costituisce una complicanza delle sepsi batteriche gravi. Essa comporta collasso cardiocircolatorio, coagulazione intravascolare disseminata e gravi alterazioni metaboliche (vedi sopra). Lo shock settico è dovuto all'attivazione dei TLR da parte dell'LPS o dell'acido lipoteicoico, che risulta in un'abnorme produzione di TNF e di altre citochine, quali IL-12, IFN-γ e IL-1. La concentrazione sierica di TNF ha valore prognostico per l'andamento delle infezioni batteriche gravi. Lo shock settico viene riprodotto sperimentalmente somministrando LPS, acido lipoteicoico o TNF agli animali da laboratorio. In queste condizioni, gli antagonisti del TNF prevengono effettivamente la morte degli animali. Purtroppo, nei pazienti con sepsi non si sono ottenuti risultati apprezzabili né utilizzando anticorpi anti-TNF né impiegando recettori solubili per questa citochina. Le ragioni di tale insuccesso sono sconosciute, ma potrebbero essere ricondotte alla capacità di altre citochine di svolgere azioni simili a quelle del TNF.

Una sindrome simile allo shock settico può verificarsi come complicanza di malattie non infettive, come ustioni gravi, trauma, pancreatite e altre condizioni severe. Si tratta della cosiddetta sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS).

L'infiammazione acuta può causare un danno tissutale poiché i meccanismi effettori utilizzati dai fagociti per uccidere i microbi sono tossici anche per i tessuti dell'ospite. Se particolarmente abbondanti, gli enzimi proteolitici e i ROS rilasciati dai fagociti e accumulati nella sede di infezione danneggiano anche le cellule dell'ospite e degradano la matrice extracellulare, specialmente quando il patogeno resiste all'uccisione e continua a stimolare l'immunità innata. In effetti, almeno una parte delle patologie associate alle infezioni dipendono dalla risposta infiammatoria più che dal diretto effetto tossico dei microbi. L'infiammazione acuta è anche responsabile del danno tissutale nelle malattie autoimmuni: anche in questi casi il TNF, l'IL-1, l'IL-6 e l'IL-12 sono fondamentali per indurre l'infiammazione, sebbene neutrofili e macrofagi si accumulino e si attivino per cause diverse rispetto all'infiammazione indotta da patogeni, e cioè a causa del riconoscimento di antigeni self da parte dell'immunità adattiva (vedi Cap. 15). Gli antagonisti di tutte queste citochine o dei relativi recettori sono in uso clinico o nell'ambito di studi volti alla valutazione di strategie di riduzione dell'infiammazione in pazienti con malattie infiammatorie come artrite reumatoide, malattia infiammatoria intestinale e psoriasi.

RISPOSTA ANTIVIRALE

L'immunità innata reagisce alle infezioni virali prevalentemente tramite la produzione di IFN di tipo I, la cui azione principale è l'inibizione della replicazione virale. Abbiamo già discusso precedentemente come svariati PRR, tra cui alcuni TLR, NLR, RLR e STING, generino segnali che stimolano l'espressione di IFN-α e IFN-β. Gli IFN di tipo I vengono secreti dalle cellule che esprimono tali PRR e agiscono su altre cellule per prevenire la diffusione dell'infezione. In questo paragrafo descriveremo le principali caratteristiche degli IFN di tipo I e i loro effetti antivirali.

Con il termine "IFN di tipo I" si intende una grande famiglia di citochine correlate dal punto di vista strutturale e funzionale, che mediano la risposta immunitaria innata alle infezioni virali. Il termine *interferone* deriva dalla capacità di queste citochine di interferire con lo sviluppo dell'infezione virale. Esistono diversi tipi di IFN di tipo I, che sono strutturalmente omologhi e codificati da un cluster di geni presenti sul cromosoma 9. I più importanti per le difese antivirali sono gli IFN-α (che in effetti sono un gruppo di 13 diverse proteine strettamente correlate) e l'IFN-β, che è invece un'unica proteina. Le cellule dendritiche plasmacitoidi sono la principale fonte di IFN-α, che viene però prodotto anche dai fagociti mononucleati. L'IFN-β è invece prodotto da svariati tipi cellulari. Gli acidi nucleici virali sono lo stimolo più potente in grado di indurre la sintesi di IFN di tipo I. Rammentiamo che i recettori citosolici di tipo RIG, i sensori di DNA e i TLR a localizzazione endosomiale (TLR 3, 7, 8 e 9) riconoscono gli acidi nucleici virali e attivano i fattori di trascrizione della famiglia IRF, i quali sono responsabili dell'espressione dei geni che codificano per gli IFN di tipo I (Fig. 4.16).

Sia l'IFN-α che l'IFN-β legano un unico recettore eterodimerico denominato *recettore per gli IFN di tipo I*, composto da due catene polipeptidiche strutturalmente correlate (denominate IFNAR1 e IFNAR2) ed espresso in maniera ubiquitaria. Questo recettore attiva i fattori trascrizionali STAT1, STAT2 e IRF9 che determinano la trascrizione di geni coinvolti in diversi meccanismi anti-virali:

- ***Conferimento del cosiddetto "stato antivirale" alle cellule bersaglio, ovvero di resistenza alle infezioni virali*** (Fig. 4-17). Tra i geni indotti dagli IFN di tipo I vi sono la PKR, una serinatreonina chinasi attivata dall'RNA a doppia catena (*double-stranded RNA*, dsRNA) che blocca la trascrizione e la traduzione virale, la 2′,5′ oligoadenilato sintetasi e le RNasi L, che favoriscono la degradazione dell'RNA virale. L'azione antivirale degli IFN di tipo I si esplica principalmente attraverso un meccanismo paracrino in cui la cellula infettata secerne IFN che agiscono sulle cellule limitrofe non ancora infettate, rendendole resistenti. Gli effetti degli IFN di tipo I non sono specifici per i virus e parte della capacità di queste citochine di bloccare la diffusione dell'infezione è ascrivibile alla loro tossicità per le cellule dell'ospite poste nelle vicinanze delle cellule infette. L'IFN secreto da una cellula può anche agire in modo autocrino, inibendo la replicazione virale nella cellula che l'ha prodotto.

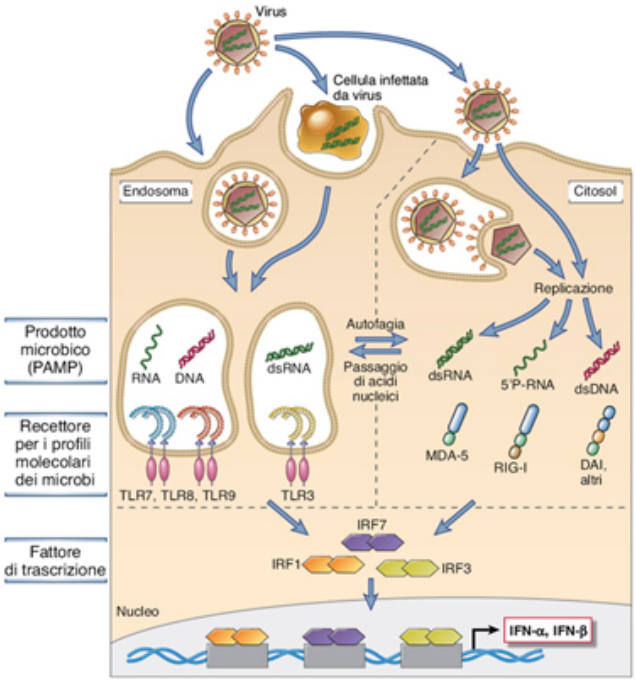


FIGURA 4-16 Meccanismi di induzione degli interferoni di tipo I da parte di virus. Gli acidi nucleici e le proteine virali sono riconosciuti da numerose famiglie di recettori cellulari (TLR, recettori citosolici di tipo RIG o RLR, quali MDA-5, RIG-I, DAI e altri, e sensori di DNA citosolico), che attivano i fattori di trascrizione (le proteine IRF) che stimolano la produzione degli interferoni di tipo I, IFN-α e IFN-β.

- ***Segregazione dei linfociti nei linfonodi, per massimizzare l'opportunità di incontro con l'antigene***. Ciò avviene grazie all'espressione di una proteina, chiamata CD69, che forma un complesso con il recettore per la sfingosina 1-fosfato (*Sphingosine 1-Phosphate Receptor*, S1PR1) riducendone l'espressione. Nel Capitolo 3 abbiamo visto come la fuoriuscita dei linfociti dai tessuti linfoidi dipenda dal legame della sfingosina 1-fosfato (*Sphingosine 1-Phosphate*, S1P) con l'S1PR1; ne consegue che la sua ridotta espressione trattiene i linfociti negli organi linfoidi.
- ***Aumento della citotossicità delle cellule NK e dei linfociti CD8$^+$ citotossici e differenziamento dei linfociti T naïve in cellule effettrici T_H1.*** Ciò stimola sia l'immunità innata che quella adattativa contro le infezioni intracellulari virali e batteriche.
- ***Aumento dell'espressione di molecole MHC di classe I per aumentare la probabilità che le cellule infettate siano riconosciute e uccise dai linfociti CD8$^+$ citotossici***. I linfociti T CD8$^+$ citotossici riconoscono sulla superficie delle cellule infettate peptidi virali presentati da molecole MHC di classe I (il riconoscimento del complesso peptide-MHC e l'uccisione da parte dei linfociti T CD8$^+$ verranno descritti nei Capp. 6 e 11). Aumentando l'espressione di molecole MHC di classe I, gli IFN di tipo I aumentano indirettamente anche il numero di complessi "peptide virale-MHC di classe I" che possono essere riconosciuti dai linfociti T CD8$^+$ e ciò facilita l'uccisione della cellula sede della replicazione virale e l'eradicazione dell'infezione stessa.

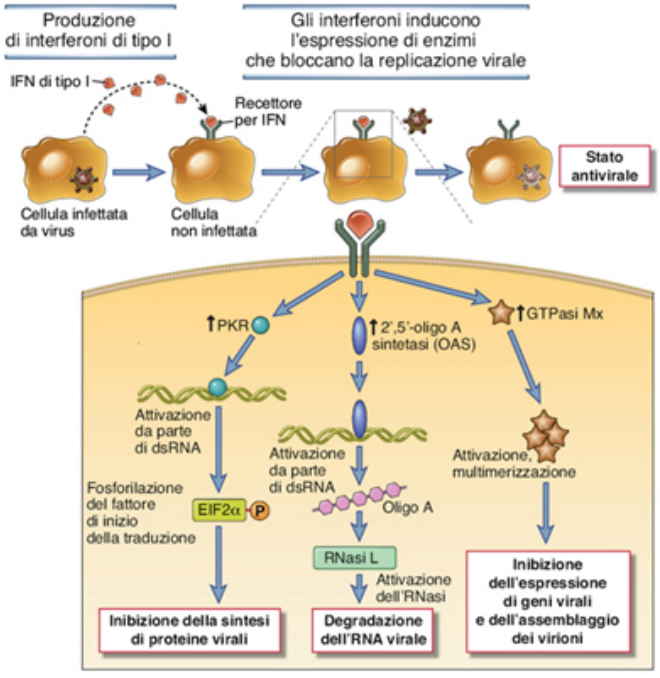


FIGURA 4-17 Azioni biologiche degli interferoni di tipo I. Gli interferoni di tipo I, IFN-α e IFN-β sono prodotti da cellule infettate da virus in risposta a segnali innescati dai TLR o da altri sensori di RNA virale. Gli IFN di tipo I si legano a recettori espressi sulle superficie di cellule vicine non infettate ed attivano la via di trasduzione JAK-STAT che induce l'espressione di geni i cui prodotti inibiscono la replicazione virale. Gli IFN di tipo I si legano anche a recettori espressi sulla superficie di cellule infettate ed attivaano la trascrizione di geni i cui prodotti aumentano la suscettibilità della cellula all'uccisione da parte dei linfociti CTL. PKR, proteinchinasi attivata da RNA a doppio filamento.

In conclusione, gli IFN di tipo I esplicano diverse funzioni che lavorano in concerto per contrastare le infezioni virali. I topi knockout per il recettore di questi IFN sono più sensibili alle infezioni virali. L'IFN-α viene usato in clinica in alcune forme di epatite virale. Inoltre, probabilmente perché stimola l'attività dei linfociti T CD8 citotossici o inibisce la proliferazione cellulare, si è dimostrato efficace per il trattamento di alcuni tumori. L'IFN-β è utilizzato come terapia per la sclerosi multipla, ma i meccanismi del suo effetto terapeutico non sono noti.

La protezione contro i virus si esercita anche mediante l'attivazione di meccanismi apoptotici intrinseci e l'aumento della sensibilità a stimoli apoptotici estrinseci nelle cellule infettate. Le proteine virali sintetizzate nelle cellule infettate possono avere una conformazione terziaria non corretta e il loro accumulo può culminare nell'apoptosi della cellula. Inoltre, le cellule infettate da virus sono particolarmente sensibili all'apoptosi causata da TNF. Infine, le cellule infettate diventano più sensibili agli effetti proapoptotici del TNF, abbondantemente rilasciato insieme agli IFN di tipo I dalle cellule dendritiche plasmacitoidi e dai macrofagi attivati. Il recettore di tipo I per il TNF attiva sia vie proinfiammatorie che proapoptotiche. Quale delle due predomini nelle singole situazioni dipende dallo stato della sintesi proteica nella cellula bersaglio: le infezioni virali possono spostare l'equilibrio verso l'apoptosi.

ATTIVAZIONE DELL'IMMUNITÀ ADATTATIVA

L'immunità innata fornisce segnali che agiscono di concerto con l'antigene per stimolare la proliferazione e il differenziamento di linfociti T e B specifici. La risposta innata non solo costituisce una prima linea di difesa contro i patogeni, ma dà anche inizio alle risposte adattative. La stimolazione dei linfociti richiede due segnali distinti: il primo è costituito dal riconoscimento dell'antigene, mentre il secondo è rappresentato da molecole prodotte dall'immunità innata contro i microbi o le cellule danneggiate (Fig. 4-18). Questo modello viene definito **ipotesi del doppio segnale** per l'attivazione dei linfociti. La presenza dell'antigene (il cosiddetto segnale 1) assicura che la risposta sia specifica, mentre gli stimoli forniti dal riconoscimento microbico o dalle reazioni innate contro i microbi (segnale 2) assicura che ci sia un'attivazione solo in presenza di un'infezione e non quando i linfociti riconoscono antigeni non pericolosi, come quelli self. Le molecole prodotte durante le reazioni dell'immunità innata che funzionano come secondo segnale per l'attivazione dei linfociti comprendono le proteine costimolatorie (per i linfociti T), le citochine (per i linfociti T e B) e i prodotti di degradazione del

complemento (per i linfociti B). Torneremo a occuparci della natura dei secondi segnali nei Capitoli 9 e 12.

I secondi segnali generati durante le risposte immunitarie innate anti-microbiche non solo amplificano l'entità della risposta adattativa, ma ne influenzano anche la natura. Un'importante funzione dell'immunità cellulare è quella di attivare i macrofagi a uccidere i microrganismi intracellulari e a indurre robuste risposte infiammatorie, così da assicurare il richiamo nel tessuto infettato di un numero sufficientemente elevato di fagociti. Quando i fagociti incontrano i microbi, i TLR e gli altri PRR stimolano la secrezione di citochine e le risposte T, che a loro volta attivano e reclutano i fagociti per uccidere i microbi. Questi processi sono mediati da citochine. Pertanto, la risposta immunitaria innata dei macrofagi ai microbi stimola la risposta adattativa dei linfociti T che è efficace contro tali microbi.

Viceversa, numerosi microbi extracellulari che entrano nel sangue attivano la via alternativa del complemento, che promuove la produzione di anticorpi da parte dei linfociti B. Questi anticorpi opsonizzano i microbi e ne promuovono la fagocitosi da parte di neutrofili e macrofagi, oppure uccidono i microbi con meccanismi che comportano l'attivazione del complemento. Pertanto, i microbi penetrati nel sangue inducono una risposta innata (attivazione del complemento) che scatena la risposta adattativa finalizzata a eliminare tali patogeni extracellulari.

Le citochine prodotte dalle cellule dell'immuntà innata stimolano la proliferazione e il differenziamento dei linfociti. Di seguito elenchiamo alcuni esempi di citochine secrete in risposta a PAMP e attive sui linfociti B e T. Abbiamo citato queste citochine in precedenza e tratteremo in dettaglio i loro ruoli nelle risposte linfocitarie nei successivi capitoli.

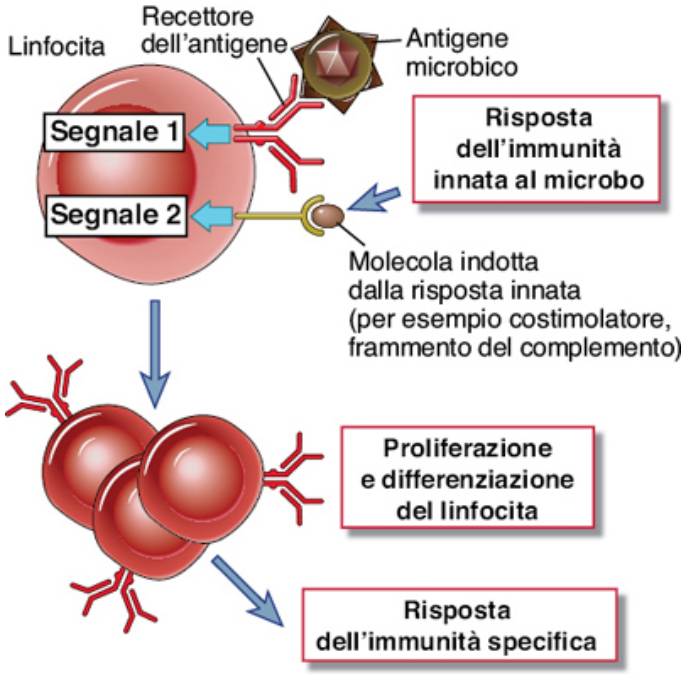


FIGURA 4-18 Stimolazione dell'immunità adattativa da parte dell'immunità innata. Il riconoscimento degli antigeni da parte dei linfociti fornisce il segnale 1 per la loro attivazione, mentre le molecole prodotte dalle cellule dell'ospite durante le risposte innate nei confronti dei microbi forniscono il segnale 2. In questa figura vengono rappresentati soltanto i linfociti B, ma gli stessi principi valgono anche per i linfociti T. La natura del secondo segnale è diversa per i linfociti B e T ed è descritta nei capitoli successivi.

- L'IL-12 stimola il differenziamento dei linfociti T $CD4^+$ naive in cellule effettrici T_H1 (vedi Cap. 10).
- L'IL-1, l'IL-6 e l'IL-23 stimolano il differenziamento dei linfociti T $CD4^+$ naïve in cellule effettrici T_H17 (vedi Cap. 10).
- L'IL-15 favorisce la sopravvivenza dei linfociti T $CD8^+$ della memoria.
- L'IL-6 promuove la produzione di anticorpi da parte di linfociti B attivati (vedi Cap. 12).

Gli **adiuvanti**, sostanze che devono essere somministrate insieme agli antigeni proteici purificati per poter stimolare in modo ottimale una risposta T (vedi Cap. 6), di fatto hanno il compito di stimolare le risposte innate nel sito di esposizione all'antigene. Gli adiuvanti sono utili nell'immunologia sperimentale e nella formulazione dei vaccini. Molti di essi, utilizzati sperimentalmente, sono prodotti microbici che legano i TLR, come i micobatteri uccisi o l'LPS. L'unico adiuvante routinariamente usato nei vaccini umani è rappresentato dai composti dell'alluminio, quali idrossido di alluminio o alluminio fosfato, che sono degli stimoli per l'attivazione dell'inflammasoma. Gli effetti degli adiuvanti sulle cellule dendritiche consistono nell'aumento dell'espressione di molecole MHC (segnale 1, necessario affinché i linfociti T riconoscano l'antigene), di molecole costimolatorie (segnale 2) e delle citochine necessarie per l'attivazione dei linfociti T e per la loro migrazione verso i linfonodi, dove sono localizzati i linfociti T.

MECCANISMI INIBITORI CHE REGOLANO LE RISPOSTE IMMUNITARIE INNATE

L'entità e la durata delle risposte innate dipendono da diversi meccanismi inibitori che sono importanti per limitare il danno tissutale. Poiché, come abbiamo già detto, la risposta infiammatoria è necessaria per la protezione contro i microbi, ma può potenzialmente causare danno tissutale e malattia, si sono evoluti molti meccanismi che hanno lo scopo di limitarla; questi meccanismi entrano in funzione insieme o poco dopo l'inizio dell'infiammazione. I PAMP e i DAMP possono essi stessi stimolare questi meccanismi di controllo. Ne descriveremo qui di seguito alcuni.

L'IL-10 è una citochina che, prodotta da macrofagi e cellule dendritiche, ne inibisce l'attivazione. L'IL-10 inibisce la produzione di diverse citochine proinfiammatorie quali l'IL-1, il TNF e l'IL-12. Essendo prodotta dalle stesse cellule che ne rappresentano il bersaglio funzionale, l'IL-10 costituisce un eccellente esempio di meccanismo di

regolazione a feedback negativo. I macrofagi attivati in modo alternativo producono una maggiore quantità di IL-10 rispetto ai macrofagi attivati in modo classico. IL-10 è prodotta da alcuni tipi cellulari non linfoidi (per esempio cheratinociti) e dai linfociti T regolatori; tratteremo il ruolo dell'IL-10 in questo contesto nel Capitolo 15.

I fagociti mononucleati producono un antagonista naturale dell'IL-1, a essa strutturalmente omologo e in grado di legare gli stessi recettori, ma biologicamente inattivo, il quale agisce perciò da inibitore competitivo; per questa ragione esso è chiamato **antagonista recettoriale dell'IL-1 (*IL-1 Receptor Antagonist*, IL-1RA).** La produzione di IL-1RA viene attivata dalla maggior parte degli stimoli che inducono anche l'IL-1. Studi in topi knockout suggeriscono che l'IL-1RA sia importante per impedire l'insorgenza di malattie infiammatorie delle articolazioni e di altri tessuti. Una preparazione di IL1-RA ricombinante viene efficacemente impiegata per il trattamento dell'artrite reumatoide e delle sindromi autoinfiammatorie, nelle quali la produzione di IL-1 è aumentata. Anche il recettore di tipo II, che lega le citochine senza trasdurre alcun segnale, regola la risposta infiammatoria attivata dall'IL-1, probabilmente agendo come una trappola (*decoy*) che inibisce competitivamente il legame della citochina al recettore funzionalmente attivo.

La secrezione di citochine infiammatorie nei diversi tipi cellulari può essere regolata dai prodotti dei geni dell'autofagia. Le mutazioni dei geni coinvolti nel processo autofagico determinano l'aumento della secrezione di IL-1 e IL-18 e predispongono allo sviluppo di malattie infiammatorie intestinali. I meccanismi in base ai quali le proteine autofagiche compromettono la sintesi delle citochine non sono completamente noti; esse potrebbero regolare l'attivazione dell'inflammasoma o la produzione di ROS. La correlazione di polimorfismi di un gene autofagico umano con la malattia infiammatoria intestinale potrebbe essere dovuta al fatto che queste proteine influenzano l'infiammazione o l'integrità epiteliale.

Esistono infine numerose vie di trasduzione inibitorie che bloccano i segnali attivatori generati dai PRR e dalle citochine proinfiammatorie. Le *proteine soppressorie del segnale citochinico* (*Suppressors Of Cytokine Signaling*, SOCS) sono inibitori delle vie di trasduzione JAK/STAT attivate dai recettori delle citochine. L'attivazione dei TLR nei macrofagi e nelle cellule dendritiche induce l'espressione di proteine SOCS, che limitano la risposta di queste cellule a citochine quali gli IFN di tipo I. Nei linfociti, una fosfatasi intracellulare detta SHP-1 regola negativamente numerose vie di trasduzione del segnale che coinvolgono la tirosina chinasi. Essa sembra in grado di inibire anche le risposte proinfiammatorie che derivano dall'attivazione dei TLR. Esistono infine altri esempi di chinasi e fosfatasi che inibiscono l'attivazione cellulare indotta da TLR, NLR e RLR.

RIEPILOGO

* L'immunità innata rappresenta la prima linea di difesa dell'ospite contro i microrganismi. I meccanismi dell'immunità innata sono preesistenti all'esposizione ai microrganismi. I componenti cellulari dell'immunità

innata comprendono le barriere epiteliali e i leucociti (neutrofili, macrofagi, cellule NK, linfociti con recettori invarianti e mastociti).

* L'immunità innata utilizza recettori cellulari (localizzati sulla membrana cellulare o endosomiale oppure nel citosol) detti recettori di riconoscimento di profili molecolari (PRR), che riconoscono strutture chiamate profili molecolari associati ai patogeni (PAMP), condivisi da microrganismi diversi e non presenti sulle cellule dei mammiferi. Spesso, i PAMP sono strutture essenziali per la sopravvivenza dei microrganismi stessi e questo limita la capacità dei microbi di eludere il riconoscimento da parte del sistema immunitario attraverso la riduzione della loro espressione o l'espressione di molecole mutate. Inoltre, questi recettori riconoscono molecole prodotte dall'ospite ma la cui espressione o localizzazione indica danno cellulare, dette perciò profili molecolari associati al danno (DAMP).
* I TLR, presenti sulla superficie cellulare o negli endosomi, costituiscono la famiglia più importante di PRR e sono in grado di riconoscere un'ampia gamma di ligandi, inclusi componenti della parete batterica e acidi nucleici. Esistono PRR citosolici che riconoscono molecole microbiche. Questi comprendono i recettori di tipo RIG (RLR), che riconoscono l'RNA virale, sensori di DNA citosolico (CDS), e i recettori di tipo NOD (NLR), che riconoscono costituenti della parete batterica e cristalli, come per esempio cristalli intracellulari, ROS e vari altri indicatori di infezione o lesione cellulare.
* I PRR, quali TLR e RLR, trasducono segnali che attivano i fattori di trascrizione NF-κB e AP-1, che stimolano l'espressione di geni infiammatori, e i fattori trascrizionali IRF, che promuovono l'espressione dei geni per gli IFN di tipo I ad attività antivirale. L'inflammasoma, un complesso specializzato contenente NLR che si forma in risposta ai PAMP e ai DAMP, è composto da un recettore di tipo NOD, da un adattatore e dall'enzima caspasi-1, la cui funzione è produrre le forme attive delle citochine proinfiammatorie IL-1 e IL-18.
* I PRR solubili e le molecole effettrici che si trovano nel plasma comprendono le pentrassine (come la PCR), le collectine (come la MBL) e le ficoline. Queste molecole riconoscono le strutture microbiche e ne facilitano la rimozione da parte di meccanismi complemento-dipendenti e complemento-indipendenti.
* Le cellule NK sono uno dei numerosi tipi di cellule linfoidi innate che assolvono a funzioni effettrici condivise dai linfociti T, ma non esprimono recettori specifici per l'antigene. Le cellule NK svolgono un'azione di difesa nei confronti dei microrganismi intracellulari, uccidendo le cellule infettate e producendo IFN-γ in grado di attivare i macrofagi. Il riconoscimento delle cellule infettate da parte delle cellule NK è regolato da una combinazione di recettori attivatori e inibitori. I recettori inibitori riconoscono le molecole MHC di classe I, grazie alle quali le cellule NK risparmiano le cellule normali, ma uccidono le cellule in cui l'espressione di molecole MHC di classe I è ridotta, come nel caso delle cellule infettate dai virus.
* Il sistema del complemento comprende numerose proteine plasmatiche che vengono attivate in sequenza dal taglio proteolitico. I frammenti generati delle proteine C3 e C5 promuovono l'infiammazione e funzionano da opsonine, facilitando la fagocitosi dei microbi. L'attivazione del complemento porta all'uccisione di alcuni tipi di batteri mediante la generazione di pori nella loro membrana. Il sistema del complemento si attiva sulle superfici microbiche ma non sulle cellule normali dell'ospite, poiché queste esprimono proteine che ne inibiscono la funzione. Nelle risposte innate, il complemento è attivato soprattutto spontaneamente dalle superfici microbiche o dalla lectina che lega il mannosio a iniziare rispettivamente le vie alternativa e lectinica.
* Le due principali funzioni effettrici dell'immunità innata sono l'attivazione della risposta infiammatoria, che comporta il reclutamento nel tessuto infiammato di leucociti con attività microbicida e molecole effettrici solubili, e il blocco della propagazione virale, mediato dagli IFN di tipo I. Entrambi i meccanismi sono innescati dai PAMP e dai DAMP, i quali trasducono segnali che attivano fattori di trascrizione che portano all'espressione di citochine e di altri mediatori infiammatori.
* Le citochine, prodotte prevalentemente da macrofagi attivati, sono i principali mediatori della risposta infiammatoria. Il TNF e l'IL-1 attivano le cellule endoteliali, stimolano la produzione di chemochine e aumentano la produzione di neutrofili da parte del midollo osseo. Entrambe promuovono la produzione di IL-6, e tutte e tre le citochine sono responsabili di effetti sistemici quali febbre e sintesi di proteine di fase acuta a livello epatico. L'IL-12 e l'IL-18 stimolano la produzione di IFN-γ, che attiva i macrofagi, da parte delle cellule NK e dei linfociti T. Queste citochine funzionano nelle risposte innate nei confronti di diverse classi di microbi e alcune (IL-1, IL-6, IL-12, IL-18) indirizzano le susseguenti risposte adattative.
* I neutrofili e i monociti (i precursori dei macrofagi tissutali) migrano dal sangue ai focolai infiammatori durante la risposta innata a causa dell'effetto delle citochine e delle chemochine prodotte localmente in seguito allo stimolo da parte dei PAMP e dei DAMP.

* I neutrofili e i macrofagi fagocitano i microbi e li uccidono producendo ROS, NO ed enzimi nei fagolisosomi. I macrofagi producono anche citochine che stimolano l'infiammazione e promuovono il rimodellamento tissutale nel sito di infezione. I fagociti riconoscono e rispondono ai prodotti microbici grazie a recettori quali TLR, lectine di tipo-C, recettori scavenger e recettori *N*-FMLP.
* Le molecole prodotte durante la risposta innata stimolano l'immunità specifica e ne influenzano la natura. Le cellule dendritiche attivate dai microbi producono citochine e molecole costimolatorie che promuovono l'attivazione dei linfociti T e il loro differenziamento in cellule effettrici. I frammenti del complemento generati dalla via alternativa agiscono da secondi segnali per l'attivazione dei linfociti B e la produzione di anticorpi.
* Le risposte immunitarie innate sono regolate da meccanismi di feedback negativo che limitano il potenziale danno tissutale. L'IL-10 è una citochina che, prodotta da macrofagi e cellule dendritiche, è in grado di inibirne l'attività. La secrezione di citochine proinfiammatorie è regolata anche dai prodotti dei geni dell'autofagia. Infine, vie di trasduzione inibitorie bloccano i segnali attivatori generati dai PRR e dalle citochine infiammatorie.

LETTURE CONSIGLIATE

Recettori per i profili molecolari (PRR)

Blasius A.L.; Beutler B. Intracellular Toll-like receptors. *Immunity* 32:305–315 (2010).

Canton J.; Neculai D.; Grinstein S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nature Reviews Immunology* 13:621–634 (2013).

Chen G.; Shaw M.H.; Kim Y.G.; Nuñez G. Nod-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annual Review of Pathology* 4:365–398 (2009).

Dixit E.; Kagan J. Intracellular pathogen detection by RIG-I-like receptors. *Advances in Immunology* 117 99–125 (2013).

Elinav E.; Strowig T.; Henao-Mejia J.; Flavell R.A. Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins. *Immunity* 34:665–679 (2011).

Goubau D.; Deddouche S.; Reis C.; Sousa E. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity* 38:855–869 (2013).

Hornung V.; Latz E. Intracellular DNA recognition. *Nature Reviews Immunology* 10:123–130 (2010).

Janeway C.A.; Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 20:197–216 (2002).

Kawai T.; Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* 11:373–384 (2010).

Latz E.; Xiao T.S.; Stutz A. Activation and regulation of the inflammasome. *Nature Reviews Immunology* 13:397–411 (2013).

Martonez-Pomares L. The mannose receptor. *Journal of Leukocyte Biology* 92:1177–1186 (2012).

Osorio F.; Reis e Sousa C. Myeloid C-type lectin receptors in pathogen recognition and host defense. *Immunity* 34:651–664 (2011).

Takeuchi O.; Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140:805–820 (2010).

Wu J.; Chen Z.J. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annual Review of Immunology* 32:461–488 (2014).

Cellule dell'immunità innata

Amulic B.; Cazalet C.; Hayes G.L.; Metzler K.D.; Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual Review of Immunology* 30:459–489 (2012).

Dale D.C.; Boxer L.; Liles W.C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 112:935–945 (2008).

Davies L.C.; Jenkins S.J.; Allen J.E.; Taylor P.R. Tissue-resident macrophages. *Nature Immunology* 14:986–995 (2013).

Flannagan R.S.; Jaumouille V.; Grinstein S. The cell biology of phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 7:61–98 (2012).

Lanier L.L. NK cell recognition. *Annual Review of Immunology* 23:225–274 (2005).

Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *The Journal of Experimental Medicine* 10:1283–1299 (2013).

Molawi J.K.; Sieweke M.H. Transcriptional control of macrophage identity, self-renewal, and function. *Advances in Immunology* 120:269–300 (2013).
Murray P.J.; Wynn T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology* 11:723–737 (2011).
Schenten D.; Medzhitov R. The control of adaptive immune responses by the innate immune system. *Advances in Immunology* 109:87–124 (2011).
Serbina N.V.; Jia T.; Hohl T.M.; Pamer E.G. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annual Review of Immunology* 26:421–452 (2008).
Sun J.C.; Lanier L.L. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8+ T cells. *Nature Reviews Immunology* 11:645–745 (2011).
Walker J.A.; Barlow J.L.; McKenzie A.N. Innate lymphoid cells–how did we miss them? *Nature Reviews Immunology* 13:75–87 (2013).
Vivier E.; Tomasello E.; Baratin M.; Walzer T.; Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nature Immunology* 9:503–510 (2008).

Molecole effettrici dell’immunità innata

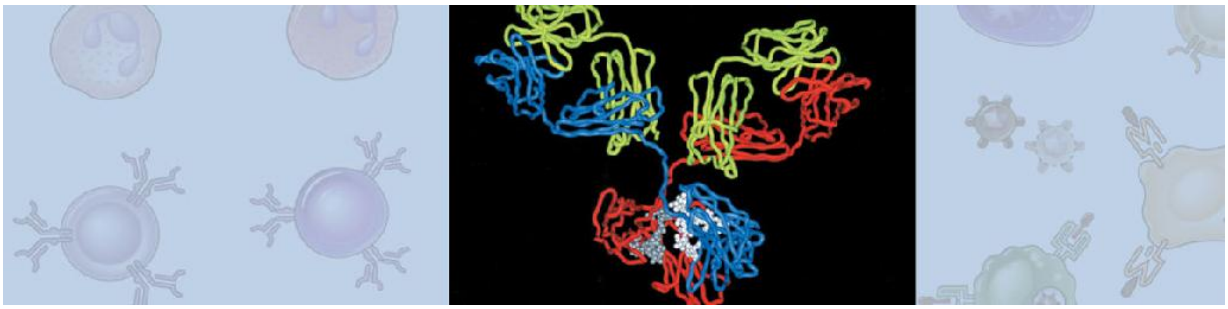
Bottazzi B.; Doni A.; Garlanda C.; Mantovani A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annual Review of Immunology* 28:157–183 (2010).
Ivashkiv L.B.; Donlin L.T. Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology* 14:36–50 (2014).
Lamkanfi M.; Dixit V.M. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28:137–161 (2012).
Linden S.K.; Sutton P.; Karlsson N.G.; Korolik V.; McGuckin M.A. Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunology* 1:183–197 (2008).
Rock K.L.; Latz E.; Ontiveros F.; Kono H. The sterile inflammatory response. *Annual Review of Immunology* 28:321–342 (2010).
Schroder K.; Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 140:821–832 (2010).
Selsted M.E.; Ouellette A.J. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nature Immunology* 6:551–557 (2005).
Sims J.E.; Smith D.E. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature Reviews Immunology* 10:89–102 (2010).
Van de Wetering J.K.; van Golde L.M.G.; Batenburg J.J. Collectins: players of the innate immune system. *European Journal of Biochemistry* 271:229–249 (2004).

Ruolo patogenetico dell’immunità innata

Angus D.C.; van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *New England Journal of Medicine* 369:840–851 (2013).
Deutschman C.S.; Tracey K.J. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity* 40:463–475 (2014).
Park H.; Bourla A.B.; Kastner D.L.; Colbert R.A.; Siegel R.M. Lighting the fires within: the cell biology of autoinflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology* 12:570–580 (2012).
Stearns-Kurosawa D.J.; Osuchowski M.F.; Valentine C.; Kurosawa S.; Remick D.G. The pathogenesis of sepsis. *Annual Review of Pathology* 6:19–48 (2011).

CAPITOLO

5



Anticorpi e antigeni

STRUTTURA DEGLI ANTICORPI

Caratteristiche generali della struttura degli anticorpi

Caratteristiche strutturali delle regioni variabili degli anticorpi

Caratteristiche strutturali delle regioni costanti degli anticorpi

Anticorpi monoclonali

SINTESI, ASSEMBLAGGIO ED ESPRESSIONE DEGLI ANTICORPI

Emivita degli anticorpi

LEGAME DEGLI ANTICORPI AGLI ANTIGENI

Caratteristiche degli antigeni di interesse biologico

Basi strutturali e chimiche del legame con gli antigeni

RAPPORTO FRA STRUTTURA E FUNZIONE NELLE MOLECOLE ANTICORPALI

Caratteristiche correlate al riconoscimento dell'antigene

Caratteristiche correlate alle funzioni effettrici

RIEPILOGO

Gli anticorpi sono proteine circolanti, prodotte dai vertebrati in seguito all'esposizione ad agenti estranei, chiamati *antigeni*. Gli anticorpi sono incredibilmente diversi e specifici nel riconoscere strutture molecolari estranee e sono i mediatori dell'immunità umorale nei confronti di un ampio spettro di microbi. Originariamente, gli anticorpi furono definiti "antitossine" poiché scoperti come molecole sieriche in grado di fornire protezione nei confronti della tossina difterica. Il termine "**anticorpi**" fu introdotto solo in seguito, quando si comprese che quelle stesse molecole venivano prodotte e fornivano protezione non solo contro le tossine microbiche ma anche contro molte altre sostanze esogene. Le sostanze che inducevano o che venivano riconosciute dagli anticorpi sono state poi identificate con il nome di **antigeni**. Gli anticorpi, le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) (vedi Cap. 6) e i recettori per l'antigene dei linfociti T (vedi Cap. 7) sono le tre classi di molecole usate dall'immunità adattativa per legare l'antigene (Tab. 5-1). Di queste tre classi, gli anticorpi (che ricordiamo essere stati i primi a essere scoperti) rappresentano quella in grado di legare il maggior numero di antigeni, che ha la maggiore capacità di discriminare tra antigeni differenti e, infine, che ha la maggiore forza di legame con l'antigene. In questo capitolo

descriveremo la struttura degli anticorpi e la loro capacità di legare l'antigene.

TABELLA 5-1 Caratteristiche delle molecole del sistema immunitario in grado di legare l'antigene

Caratteristica	Molecola che lega l'antigene		
	Immunoglobulina (Ig)	Recettore dei linfociti T (TCR)*	Molecola MHC*
Sito di legame	Costituito da tre CDR in V_H e da tre CDR in V_L	Costituito da tre CDR in V_α e da tre CDR in V_β	Tasca di legame dei peptidi costituita dai domini α1 e α2 (classe I) o da α1 e β1 (classe II)
Natura dell'antigene che può essere legato	Macromolecole (proteine, lipidi, polisaccaridi) e piccoli composti chimici	Complessi peptide-MHC	Peptidi
Natura dei determinanti antigenici riconosciuti	Determinanti lineari e conformazionali di varie macromolecole e composti chimici	Determinanti lineari dei peptidi; solamente 2 o 3 aminoacidi di un peptide legato a una molecola MHC	Determinanti lineari dei peptidi; solamente alcuni residui aminoacidici di un peptide
Affinità del legame	K_d 10^{-7}-10^{-11} M; l'affinità media delle Ig aumenta nel corso della risposta immunitaria	K_d 10^{-5}-10^{-7} M	K_d 10^{-6}-10^{-9} M; legame estremamente stabile
On-rate e off-rate	On-rate rapido, off-rate variabile	On-rate lento, off-rate lento	On-rate lento, off-rate molto lento

CDR (*Complementary-Determining Region*), regione determinante la complementarietà; K_d, costante di dissociazione; MHC (*Major Histocompetibility Complex*), complesso maggiore di istocompatibilità (nella figura è schematizzata solo MHC II); V_H, dominio variabile delle catene pesanti delle Ig; V_L, dominio variabile delle catene leggere delle Ig; V_α, regione variabile della catena a del TCR; V_β, regione variabile della catena b del TCR (*N.d.T.*).

* La struttura e le funzioni dell'MHC e delle molecole TCR sono trattate rispettivamente nei Capitoli 6 e 7.

Gli anticorpi sono prodotti solo dai linfociti B in due distinte forme: anticorpi associati alla superficie dei linfociti B (dove agiscono da recettori per l'antigene) e anticorpi secreti (i cui compiti consistono nella neutralizzazione delle tossine, nella prevenzione dell'entrata e della proliferazione dei patogeni nell'ospite e infine nell'eliminazione dei microbi stessi). Il riconoscimento dell'antigene da parte degli anticorpi presenti sulla membrana dei linfociti B naïve induce l'attivazione e l'inizio della risposta umorale. I linfociti B attivati si differenziano in plasmacellule che secernono anticorpi dotati della stessa specificità del recettore per l'antigene. Esistono diverse forme di anticorpi secreti che si localizzano nel plasma (fase fluida del sangue), nelle secrezioni mucose e nel fluido interstiziale dei tessuti. Nella fase effettrice dell'immunità umorale, gli anticorpi secreti si legano agli antigeni, innescando meccanismi effettori che mirano all'eliminazione degli antigeni stessi.

L'eliminazione dell'antigene richiede spesso l'interazione tra l'anticorpo e alcune componenti dell'immunità innata, tra cui le proteine del complemento e alcuni tipi cellulari quali i fagociti e gli eosinofili. Le funzioni effettrici anticorpo-mediate comprendono: la neutralizzazione dei microbi e delle loro tossine; l'attivazione del sistema del complemento; l'opsonizzazione degli antigeni per facilitarne la fagocitosi; la citotossicità mediata dagli anticorpi, meccanismo attraverso cui cellule dell'immunità innata riconoscono ed eliminano cellule infettate che sono state opsonizzate da anticorpi; l'attivazione degli eosinofili per eliminare gli elminti e i parassiti. Queste funzioni sono descritte in dettaglio nel Capitolo 13.

Quando il sangue o il plasma formano un coagulo, gli anticorpi restano nella fase fluida, denominata **siero**. Il siero non contiene i fattori della coagulazione (che sono utilizzati e consumati durante la formazione del coagulo), ma possiede tutte le proteine del plasma. Il siero con un numero rilevabile di anticorpi specifici per un determinato antigene è comunemente chiamato **antisiero** e lo studio degli anticorpi e del loro legame con gli antigeni è quindi classicamente definito **sierologia**. La concentrazione di anticorpi sierici specifici per un particolare antigene è spesso calcolata determinando quante diluizioni seriali del siero devono essere fatte affinché il legame con l'antigene non sia più rilevabile; i sieri che contengono un'elevata concentrazione di anticorpi specifici per un particolare antigene sono definiti *ad alto titolo*.

Un adulto sano di 70 kg di peso produce ogni giorno circa 2-3 g di anticorpi, due terzi dei quali sono costituiti da anticorpi denominati *immunoglobuline A* (IgA), prodotti dai linfociti B attivati e dalle plasmacellule presenti a livello delle mucose del tratto gastrointestinale e di quello respiratorio e attivamente trasportati attraverso le cellule epiteliali nel lume di questi tratti. La produzione di grandi quantità di IgA riflette la vasta superficie di questi organi.

STRUTTURA DEGLI ANTICORPI

Lo studio della struttura degli anticorpi ha permesso di comprendere importanti aspetti relativi alla loro funzione e di chiarire i meccanismi alla base della diversità dei recettori per l'antigene, un argomento che ha rappresentato per lungo tempo uno dei principali problemi dell'Immunologia (vedi Cap. 8).

I primi studi sulla struttura degli anticorpi si basavano su anticorpi purificati dal sangue di individui immunizzati con vari antigeni. Questo approccio non permetteva, tuttavia, di definire con precisione la struttura anticorpale, poiché il siero contiene un insieme di anticorpi diversi, prodotti da molti cloni di linfociti B, ognuno dei quali in grado di legarsi a differenti porzioni (epitopi) di un antigene (i cosiddetti *anticorpi policlonali*). Un'opportunità molto importante per ottenere anticorpi di cui studiare la struttura fu la scoperta che i pazienti affetti da mieloma multiplo, un tumore monoclonale delle plasmacellule, spesso hanno nel sangue e nelle urine grandi quantità di anticorpi identici da un punto di vista biochimico (prodotti dal clone neoplastico). Gli immunologi osservarono che questi anticorpi potevano essere purificati come proteine omogenee e successivamente analizzati. L'aver capito che le cellule di mieloma producono immunoglobuline monoclonali ha permesso di mettere a punto una tecnica per la produzione di anticorpi monoclonali, descritta più avanti in questo capitolo. La disponibilità di popolazioni omogenee di cellule secernenti anticorpi e di plasmacellule producenti anticorpi monoclonali avrebbe poi reso possibile l'analisi strutturale dettagliata degli anticorpi e il clonaggio dei geni che li codificano, rappresentando una delle più importanti tappe nella conoscenza del sistema immunitario.

Caratteristiche generali della struttura degli anticorpi

Le proteine plasmatiche o sieriche possono essere fisicamente separate in base alla loro solubilità, in albumine e globuline, e possono essere ulteriormente distinte sulla base della loro capacità di migrare in un campo elettrico, processo denominato elettroforesi. A seconda della diversa velocità di migrazione elettroforetica le globuline si separano in gruppi; la maggior parte degli anticorpi migra nelle globuline che costituiscono il terzo gruppo, chiamate **gammaglobuline** (dalla terza lettera dell'alfabeto greco). Un altro termine utilizzato frequentemente per indicare gli anticorpi è **immunoglobuline (Ig)**, poiché gli anticorpi sono la frazione delle gammaglobuline che conferisce l'immunità. In questo testo i termini *immunoglobulina* e *anticorpo* sono usati in modo intercambiabile.

Tutti gli anticorpi condividono le stesse caratteristiche strutturali di base, ma mostrano una notevole variabilità nelle regioni che legano l'antigene. La variabilità dei domini che riconoscono l'antigene spiega la capacità dei diversi anticorpi di legarsi a un enorme numero di antigeni strutturalmente diversi. Ogni individuo possiede milioni di differenti cloni di linfociti B, ognuno dei quali in grado di produrre anticorpi con un sito di legame per l'antigene unico e che quindi ne identifica la specificità per l'antigene rispetto agli anticorpi prodotti da tutti gli altri cloni. Le funzioni effettrici e le proprietà chimico-fisiche degli anticorpi dipendono invece dalle porzioni che non legano l'antigene e sono relativamente costanti.

Una molecola anticorpale ha una struttura simmetrica, composta da due catene leggere e da due catene pesanti identiche (Fig. 5-1). Sia le catene leggere sia le catene pesanti contengono una serie di unità omologhe ripetute, ciascuna delle quali di circa 110 aminoacidi, che si ripiegano a formare una struttura globulare definita **dominio Ig** (per maggiori dettagli vedi Capp. 3 e 4). Un dominio Ig è formato da due foglietti β-planari, ciascuno composto da 3-5 "nastri" polipeptidici ad andamento antiparallelo (Fig. 5-2). I due foglietti sono tenuti insieme da un ponte disolfuro e i nastri adiacenti a ogni foglietto β sono connessi da brevi anse. La struttura aminoacidica di queste anse può essere critica per il riconoscimento dell'antigene, come si vedrà più avanti in questo stesso capitolo.

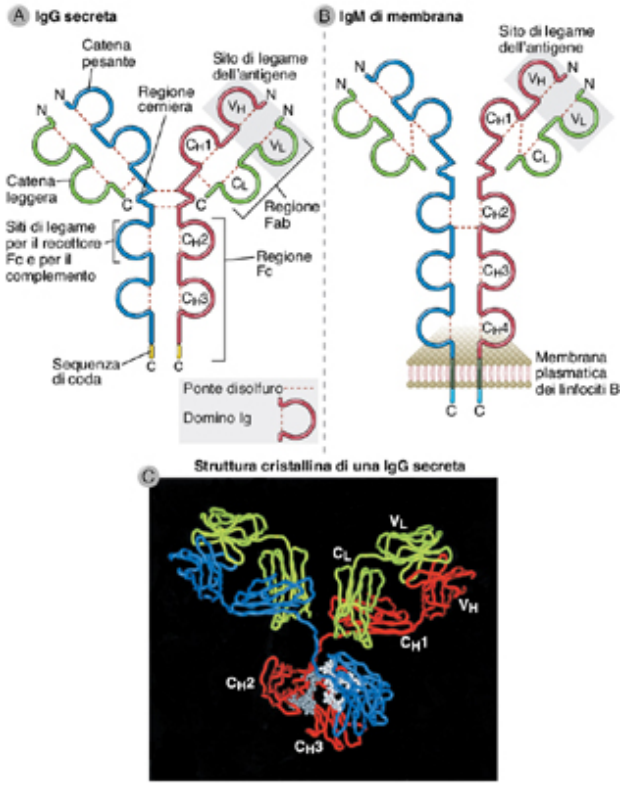


FIGURA 5-1 Struttura di una molecola anticorpale. A. Diagramma schematico di una molecola IgG secreta. I siti di legame all'antigene sono formati dalla giustapposizione dei domini V_L e V_H. Le regioni C delle catene pesanti finiscono con le regioni terminali di coda. La posizione dei siti di legame per il complemento e per il recettore per il frammento Fc, nelle regioni costanti delle catene pesanti, è molto ravvicinata. **B.** Rappresentazione schematica di una molecola IgM legata alla membrana di un linfocita B. La molecola IgM ha un dominio C_H in più delle IgG, la forma di membrana dell'anticorpo ha porzioni C-terminali transmembrana e porzioni citoplasmatiche che ancorano la molecola alla membrana plasmatica. **C.** Struttura di una molecola IgG umana come rivelato dalla cristallografia a raggi X. In questo schema a nastro di una molecola IgG secreta, le catene pesanti sono colorate in blu e rosso e le catene leggere sono colorate in verde; i carboidrati sono mostrati in grigio. (*Per gentile concessione del Dr. Alex McPherson, University of California, Irvine*.)

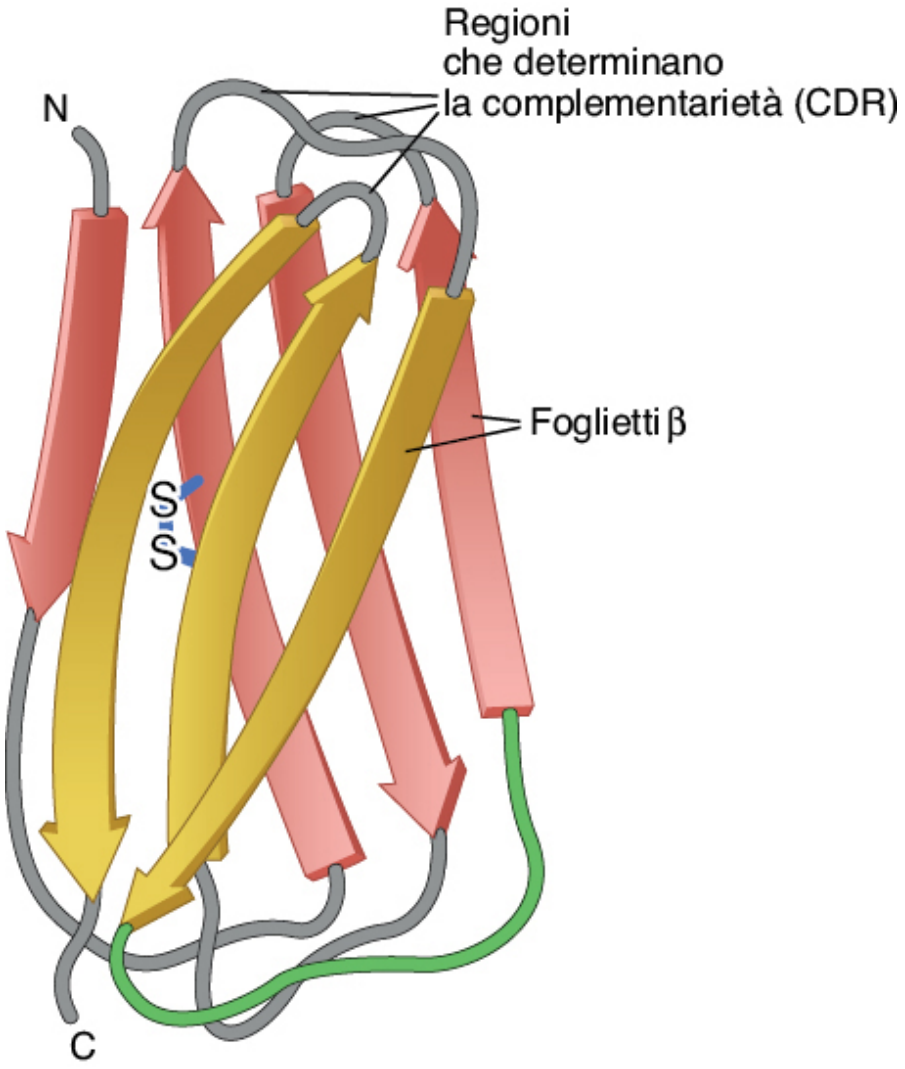


FIGURA 5-2 Struttura di un dominio Ig. Ogni dominio Ig è composto da due serie antiparallele di foglietti b, colorati in giallo e rosso, disposti a formare due foglietti β-planari, uniti da un ponte disolfuro. Il dominio costante (C) è rappresentato schematicamente con tre e quattro nastri β nei due foglietti. Si noti che le anse connettono foglietti β che a volte sono adiacenti nello stesso foglietto β-planare, ma che le anse a volte connettono i due diversi foglietti che costituiscono un dominio Ig. Tre anse in ogni regione variabile partecipano al legame con l'antigene e sono chiamate regioni determinanti la complementarietà.

Sia le catene pesanti sia quelle leggere presentano regioni variabili (V) aminoterminali, che partecipano al riconoscimento dell'antigene, e regioni costanti (C) carbossiterminali; le regioni C delle catene pesanti sono responsabili delle funzioni effettrici degli anticorpi. Nelle catene pesanti, la regione V è composta da 1 dominio Ig, mentre la regione C è composta da 3 o 4 domini Ig. Ciascuna catena leggera è costituita da una regione V con un singolo dominio Ig e da una regione C con un singolo dominio Ig. Le regioni

variabili sono così chiamate poiché le loro sequenze aminoacidiche variano tra gli anticorpi prodotti dai differenti cloni di linfociti B. La regione V di una catena pesante (V_H) e la regione V adiacente di una catena leggera (V_L) formano il *sito di legame per l'antigene* (vedi Fig. 5-1). Poiché ciascuna molecola anticorpale contiene 2 catene pesanti e 2 catene leggere, ogni anticorpo possiede almeno 2 siti di legame per l'antigene.

I domini Ig della regione costante sono distanti dal sito di legame per l'antigene e non partecipano al suo riconoscimento. Le regioni C della catena pesante interagiscono con molecole e cellule effettrici del sistema immunitario e sono responsabili della maggior parte delle funzioni biologiche svolte dagli anticorpi. Inoltre ci sono due forme di catene pesanti che sono diverse a livello della loro estremità carbossiterminale: una àncora gli anticorpi alla membrana plasmatica dei linfociti B, l'altra guida invece la secrezione degli anticorpi. Le regioni C delle catene leggere non partecipano alle funzioni effettrici degli anticorpi e nemmeno al loro ancoraggio sulla membrana cellulare.

Le catene leggere e pesanti sono legate tra di loro covalentemente da ponti disolfuro, formati tra i residui di cisteina della parte carbossiterminale della catena leggera e il dominio C_H1 della catena pesante. Inoltre, anche le interazioni non covalenti tra i domini V_L e V_H e tra i domini C_L e C_H1 contribuiscono all'associazione delle catene pesanti e leggere. In modo analogo, le due catene pesanti di ogni molecola anticorpale sono legate covalentemente da ponti disolfuro. Negli anticorpi IgG, che sono stati i primi a essere analizzati strutturalmente, i legami covalenti sono tra i residui di cisteina nei domini C_H2, vicino alla regione chiamata cerniera (*hinge*) descritta più avanti in questo stesso capitolo. In altri isotipi, i ponti disolfuro possono essere in posizioni differenti. Altre interazioni non covalenti (per esempio, fra i terzi domini C_H, come C_H3) contribuiscono all'accoppiamento delle catene pesanti.

Gli esperimenti sono serviti a capire le associazioni tra le catene delle molecole anticorpali e le funzioni delle diverse regioni degli anticorpi. In questi esperimenti le IgG di coniglio venivano tagliate con enzimi proteolitici in frammenti con caratteristiche strutturali e funzionali differenti. Nelle molecole IgG la regione cerniera non ripiegata tra i domini C_H1 e C_H2 della catena pesante costituisce il segmento più sensibile all'azione degli enzimi

proteolitici. Quando le IgG di coniglio vengono trattate con l'enzima papaina in condizioni di proteolisi limitata, l'enzima agisce a livello della regione cerniera e taglia la IgG in tre pezzi separati (Fig. 5-3, *A*). Due di questi pezzi sono identici tra loro e sono costituiti dalle catene leggere intere (V_L e C_L) associate al frammento V_H-C_H1 della catena pesante. Questi frammenti mantengono la capacità di legare l'antigene perché contengono i domini V_L e V_H appaiati e vengono chiamati *frammento con il sito di legame per l'antigene* (*Fragment, antigen binding*, **Fab**). Il terzo pezzo è composto da due polipeptidi identici legati da ponti disolfuro, ognuno contenente i domini C_H2 e C_H3 della catena pesante. Questi frammenti di IgG tendono ad aggregarsi tra loro e a cristallizzare formando un reticolo. Sono perciò chiamati *frammenti cristallizzabili* (*Fragment cristallizable*, **Fc**). Quando si usa la pepsina (invece della papaina) per tagliare le IgG di coniglio, sempre in condizioni di proteolisi limitata, la proteolisi avviene in un punto distale rispetto alla regione cerniera, dando origine a un frammento $F(ab')_2$ dotato di due identici siti di legame all'antigene e che mantiene intatti la regione cerniera e i ponti disolfuro tra le catene (vedi Fig. 5-3, *B*).

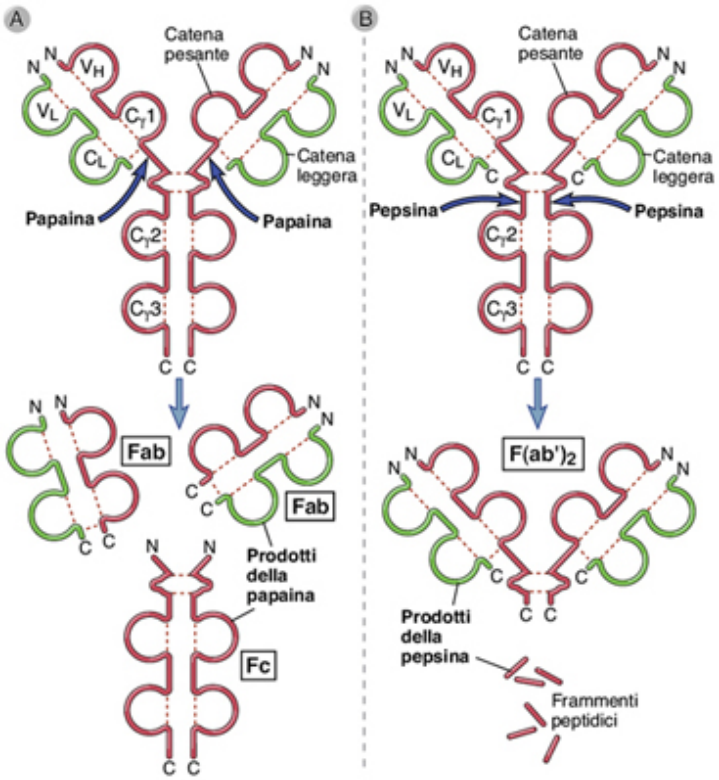


FIGURA 5-3 Frammenti proteolitici di una molecola di IgG. Le molecole IgG di coniglio sono tagliate dagli enzimi papaina (**A**) e pepsina (**B**) nel sito indicato dalle *frecce*. La digestione con papaina permette la separazione di due frammenti in grado di legare l'antigene (frammenti Fab) dalla porzione dell'anticorpo IgG che attiva il complemento e che si lega ai recettori per Fc (frammento Fc). La pepsina genera un singolo frammento bivalente in grado di legare l'antigene, $F(ab')_2$. Tutte queste caratteristiche strutturali dedotte dagli esperimenti di proteolisi controllata delle IgG di coniglio sono comuni anche agli anticorpi delle altre specie.

La proteolisi limitata con pepsina o papaina di isotipi diversi dalle IgG, o di IgG di specie diverse dal coniglio, non dà sempre gli stessi risultati ottenuti con le IgG di coniglio. In ogni caso l'organizzazione delle molecole anticorpali dedotta dalla proteolisi delle IgG di coniglio è comune a tutte le Ig indipendentemente dall'isotipo e dalla specie considerata. In realtà gli esperimenti hanno fornito la prima evidenza che le funzioni di riconoscimento dell'antigene e le funzioni effettrici delle Ig siano mediate da parti dell'anticorpo spazialmente distinte.

Ci sono molte altre proteine che appartengono al sistema immunitario e che, nonostante non possiedano alcuna funzione immunologica, conservano domini con struttura simile alle Ig, cioè due foglietti β-planari, tenuti insieme da un ponte disolfuro. Tutte le molecole che contengono questo tipo di dominio si dice che appartengono alla **superfamiglia delle Ig** e si ritiene che tutte le porzioni di geni che codificano per i domini Ig di queste molecole si siano evoluti da un unico gene ancestrale. I domini Ig sono classificati come di tipo V o di tipo C a seconda di un'omologia più stretta con i domini V o C delle Ig. I domini V sono formati da un polipeptide di lunghezza maggiore rispetto ai domini C e contengono due ulteriori foglietti β all'interno del gomitolo costituito dai foglietti β. Alcuni membri della superfamiglia delle Ig (le molecole di adesione endoteliale ICAM-1 e VCAM-1 e i recettori KIR delle cellule NK) sono già stati descritti nei Capitoli 3 e 4, rispettivamente. Nella Figura 5-4 sono riportati alcuni esempi di membri della superfamiglia Ig, che hanno rilevanza per il sistema immunitario.

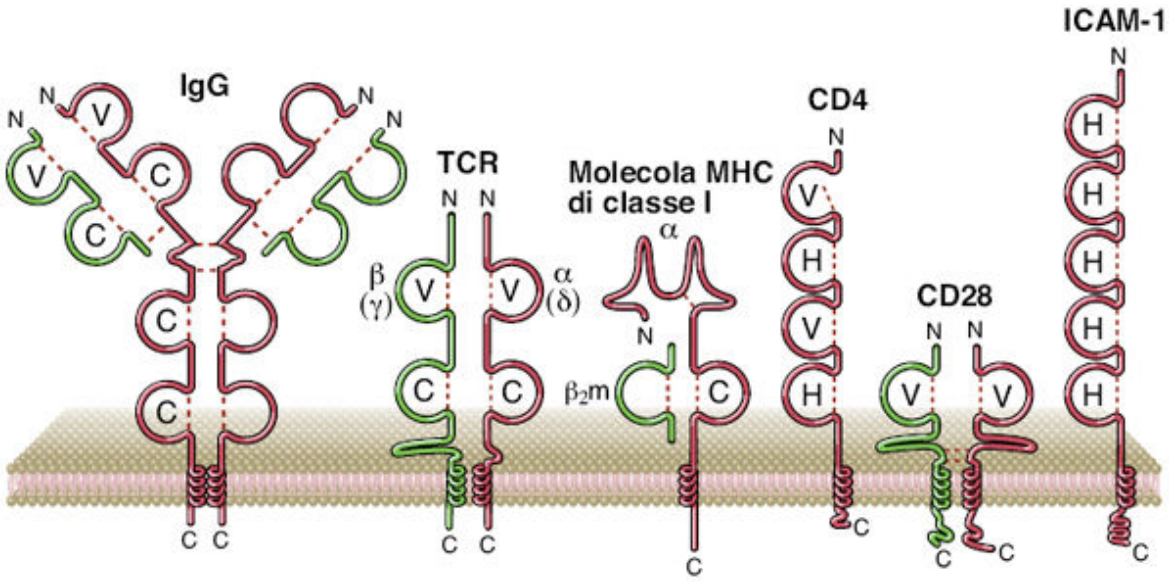


FIGURA 5-4 Esempi di proteine della superfamiglia Ig nel sistema immunitario. Vengono qui mostrati una molecola di IgG di membrana; il recettore dei linfociti T (TCR); una molecola MHC di classe I; CD4 corecettore delle cellule T; CD28 (un recettore co-stimolatorio delle cellule T); la molecola di adesione intercellulare ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule 1*).

Caratteristiche strutturali delle regioni variabili degli anticorpi

Le maggiori differenze nella sequenza e nella variabilità dei diversi anticorpi si concentrano in tre brevi segmenti della regione V_H e in tre brevi segmenti della regione V_L. Questi segmenti dotati di maggior diversità sono definiti **regioni ipervariabili**. Essi corrispondono alle tre anse che fuoriescono dalla struttura e che connettono i nastri adiacenti dei foglietti β che costituiscono i domini V delle catene pesanti e leggere delle Ig (Fig. 5-5). Le regioni ipervariabili hanno una lunghezza di circa 10 aminoacidi e sono tenute assieme da un'"intelaiatura" altamente conservata che costituisce il dominio Ig della regione V. In un anticorpo, le tre regioni ipervariabili del dominio V_L e quelle del dominio V_H si associano per creare una struttura tridimensionale che costituisce il sito di legame con l'antigene. Si può pensare alle anse ipervariabili come a delle dita che fuoriescono da ogni dominio variabile, con tre dita dalla catena pesante e tre da quella leggera che si uniscono per formare il sito di legame per l'antigene (Fig. 5-6). Poiché queste sequenze formano una superficie che è complementare alla struttura tridimensionale dell'antigene, le regioni ipervariabili sono anche dette **regioni che determinano la complementarietà** (*Complementarity-*

Determining Regions, **CDR**). Partendo dalle estremità aminoterminali dei domini V_L o V_H, queste regioni sono chiamate rispettivamente CDR1, CDR2 e CDR3. Le regioni CDR3 dei segmenti V_H e V_L sono quelle che presentano il maggiore grado di variabilità. Come sarà discusso nel Capitolo 8, vi sono particolari meccanismi genetici responsabili dell'elevata variabilità delle sequenze CDR3 rispetto alle CDR1 e alle CDR2. La diversificazione delle sequenze CDR presente nei vari anticorpi genera strutture uniche, esposte sulla superficie delle anse, che determinano la differente specificità dei diversi anticorpi. La capacità di una regione V di ripiegarsi a formare un dominio Ig è determinata soprattutto dalle sequenze altamente conservate dei tratti adiacenti alle regioni CDR. La strategia di limitare la variabilità a tre brevi sequenze permette a tutte le immunoglobuline di possedere una struttura comune, nonostante la straordinaria diversificazione della loro specificità.

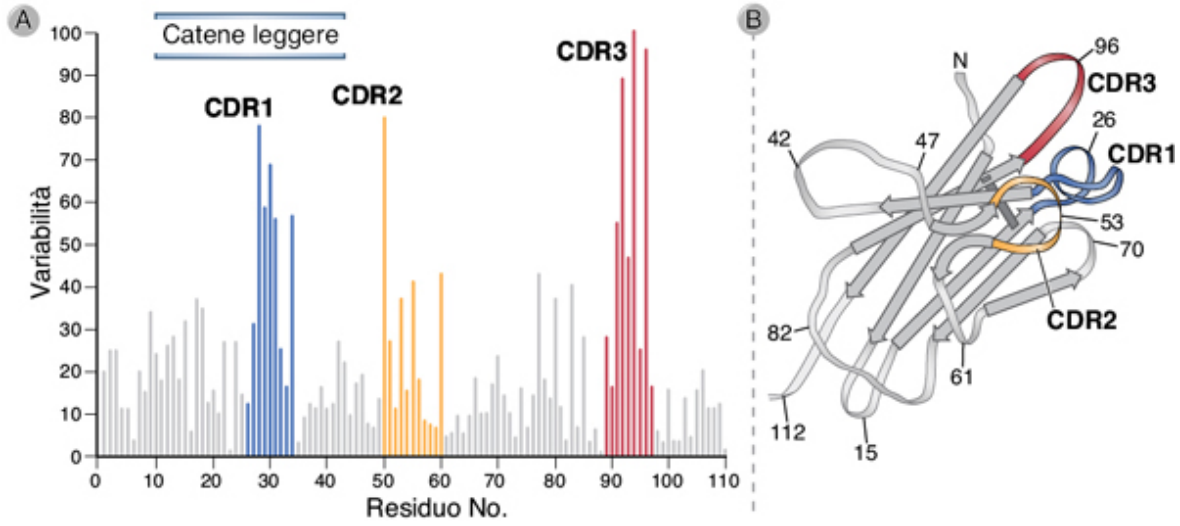


FIGURA 5-5 Regioni ipervariabili delle molecole Ig. A. Le linee verticali mostrano il grado di variabilità definito come il numero di differenze per ciascun residuo aminoacidico tra catene leggere diverse sequenziate indipendentemente, rappresentato graficamente in funzione del numero del residuo aminoacidico, misurato dall'estremità N-terminale. Questa analisi indica che la maggior parte della variabilità si concentra in tre regioni "ipervariabili", colorate in *blu*, *giallo* e *rosso*, corrispondenti rispettivamente a CDR1, CDR2 e CDR3. Tre regioni ipervariabili sono anche presenti nelle catene pesanti (non mostrate in figura). Questo modo di rappresentare la variabilità degli aminoacidi nelle Ig è definito "metodo di Kabat-Wu", dal nome dei due scienziati che originariamente svilupparono questa tecnica. **B.** Rappresentazione tridimensionale delle anse CDR ipervariabili nel dominio variabile (V) di una catena leggera. La regione V di una catena leggera è mostrata con le anse CDR1, CDR2 e CDR3 (colorate in *blu*, *giallo* e *rosso*, rispettivamente). Queste anse corrispondono alle regioni ipervariabili nel diagramma di variabilità riportato in A. Anche le regioni ipervariabili delle catene pesanti (non mostrate in figura) sono localizzate in 3 anse e tutte e 6 le anse sono giustapposte nella molecola anticorpale a formare la superficie di legame dell'antigene (vedi Fig. 5-6). (***A,*** *Per gentile concessione del Dr. E. A. Kabat, Department of Microbiology, Columbia University, College of Physicians and Surgeons, New York.*)

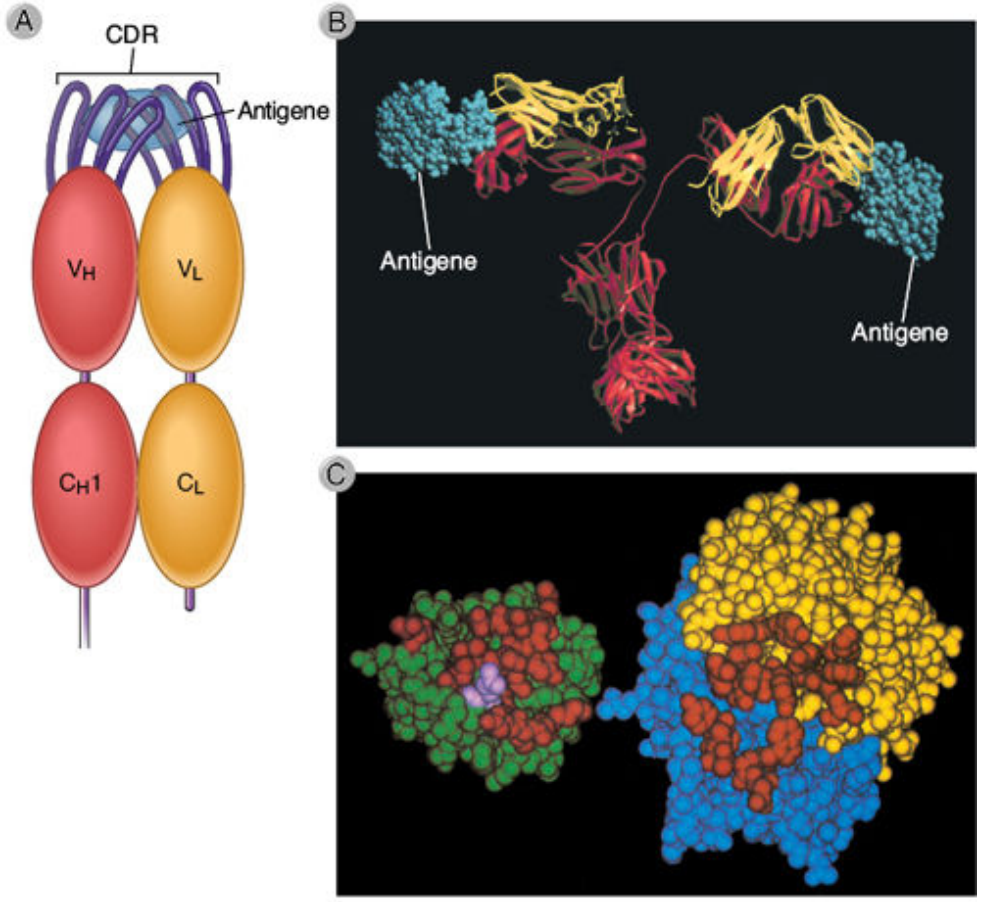


FIGURA 5-6 Legame di un antigene a un anticorpo. A. Rappresentazione schematica delle regioni determinanti la complementarietà (CDR), che danno origine al sito di legame per l'antigene. Le CDR delle catene pesanti e leggere sono anse che fuoriescono dalla superficie dei due domini variabili (V) delle Ig e insieme costituiscono il sito di legame per l'antigene. **B.** Questo modello di proteina globulare antigenica (lisozima di uovo di gallina) legata a una molecola anticorpale mostra come il sito di legame all'antigene possa accogliere delle macromolecole solubili nella loro conformazione nativa (ripiegata). Le catene pesanti dell'anticorpo sono colorate in *rosso*, le catene leggere sono *gialle* e l'antigene è colorato in *blu*. **C.** Questa figura mostra le superfici di interazione tra il lisozima di uovo di gallina (*in verde*) e un frammento Fab di un anticorpo monoclonale specifico (V_H è in *blu* e V_L in *giallo*). In *rosso* sono mostrati i residui del lisozima di uovo di gallina e di un frammento Fab che interagiscono tra loro. Un residuo di glutammina sul lisozima (in color *magenta*) si adatta a una tasca dell'anticorpo. (***B,*** *Per gentile concessione del Dr. Dan Vaughn, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.* ***C,*** *Riprodotta con autorizzazione da Amit AG, Mariuzza RA, Phillips SE, Poljak RJ: Three dimensional structure of an antigen antibody complex at 2.8A resolution. Science 233:747–753, 1986. Copyright © 1986 by AAAS.*)

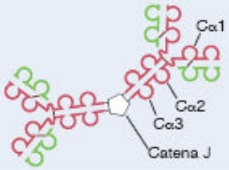
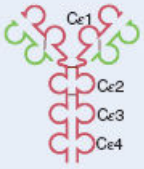
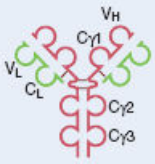
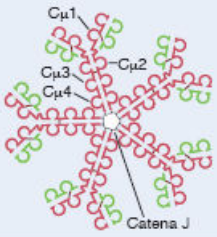
La capacità degli anticorpi di legare l'antigene dipende principalmente dalle regioni ipervariabili di V_H e V_L. Le analisi cristallografiche dei complessi antigene-anticorpo mostrano che i residui aminoacidici delle regioni ipervariabili formano contatti multipli con l'antigene legato (Fig. 5-6). Il contatto più esteso è quello che avviene a livello della terza regione (CDR3), che è anche quella con il maggiore grado di variabilità. La capacità di legare un antigene non dipende tuttavia esclusivamente dalle CDR, ma anche da altri residui delle regioni conservate che possono venire a contatto con l'antigene. In alcuni casi, una o più delle CDR può collocarsi al di fuori dalla regione di contatto con l'antigene e non partecipare al suo legame.

Caratteristiche strutturali delle regioni costanti degli anticorpi

Gli anticorpi possono essere suddivisi in classi e sottoclassi sulla base di differenze presenti nella struttura delle regioni C delle catene pesanti. Le classi anticorpali sono anche chiamate **isotipi** e sono denominate IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (Tab. 5-2). Nell'uomo, gli isotipi IgA e IgG possono essere ulteriormente suddivisi in sottoclassi strettamente correlate, denominate IgA1 e IgA2, e IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. (Nel topo, spesso utilizzato per lo studio delle risposte immunitarie, l'isotipo IgG è suddiviso nelle sottoclassi: IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3; alcuni ceppi, tra cui i C57BL/6, non hanno il gene per le IgG2a e sintetizzano un isotipo correlato, chiamato IgG2c.) Le regioni C delle catene pesanti di tutti gli anticorpi di uno stesso isotipo o sottotipo hanno essenzialmente la stessa sequenza aminoacidica. Questa sequenza è

diversa negli anticorpi di altri isotipi o sottotipi. Le catene pesanti vengono indicate con le lettere dell'alfabeto greco corrispondenti all'isotipo dell'anticorpo: le IgA1 contengono le catene pesanti α1; le IgA2 contengono le catene pesanti α2; le IgD, le catene δ le IgE, le catene ε; le IgG1, le catene γ1; le IgG2, le catene γ2; le IgG3, le catene γ3; le IgG4, le catene γ4; e le IgM, le catene μ. Nelle IgM e nelle IgE umane, le regioni C contengono quattro domini Ig (vedi Fig. 5-1). Le regioni C delle IgG, IgA e IgD contengono invece solo tre domini Ig. I domini costanti delle catene pesanti sono chiamati $\mathbf{C_H}$ e numerati a partire dall'estremità aminoterminale in direzione di quella carbossiterminale (C_H1, C_H2, C_H3, C_H4). Per ciascun isotipo, le regioni C possono essere designate in maniera più specifica (per esempio Cγ1, Cγ2, Cγ3 nelle IgG).

TABELLA 5-2 Isotipi degli anticorpi umani

Isotipo dell'anticorpo	Sottotipo (catena H)	Concentrazione nel siero (mg/ml)	Emivita nel siero (giorni)	Forma secreta		Funzioni
IgA	IgA1,2 (α1 o α2)	3,5	6	Prevalentemente dimero ma anche monomero e trimero		Immunità delle mucose
IgD	Nessuno (δ)	Tracce	3	Monomero		Recettore per l'antigene dei linfociti B naïve
IgE	Nessuno (ε)	0,05	2	Monomero		Ipersensibilità immediata, difesa contro gli elminti
IgG	IgG1-4 (γ1, γ2, γ3, o γ4)	13,5	23	Monomero		Opsonizzazione, attivazione del complemento, citotossicità cellulare anticorpo-dipendente, immunità neonatale, feedback inibitorio dei linfociti B
IgM	Nessuno (μ)	1,5	5	Pentamero		Recettore per l'antigene dei linfociti B naïve (forma monomerica), attivazione del complemento

Le funzioni effettrici degli anticorpi sono discusse in dettaglio nel Capitolo 13.

Le diverse classi e sottoclassi di anticorpi svolgono funzioni effettrici diverse. Il motivo di questo fenomeno dipende dal fatto che la maggior parte delle funzioni effettrici degli anticorpi è mediata dal legame delle regioni C_H a recettori per il frammento cristallizzabile (FcR) presenti sui diversi tipi cellulari (fagociti, cellule NK, mastociti) e ad alcune proteine plasmatiche, quali le frazioni del complemento. Le diverse classi e sottoclassi anticorpali differiscono nelle regioni C e di conseguenza si distinguono per la loro capacità di legame e per il tipo di funzioni effettrici svolte. Le funzioni effettrici mediate da ciascun isotipo anticorpale sono elencate nella Tabella 5-2 e sono approfondite alla fine di questo capitolo e nel Capitolo 13.

Gli anticorpi sono molecole flessibili in grado di legarsi a diversi tipi di antigeni. Ogni molecola anticorpale contiene almeno due siti di legame per l'antigene, ognuno formato da una coppia di domini V_H e V_L. Molte Ig possono orientare questi siti in modo che due antigeni posti su una superficie piana (per esempio, sulla superficie di una cellula) possano essere legati contemporaneamente (Fig. 5-7). Questa flessibilità deriva principalmente da una **regione cerniera** situata tra i domini C_H1 e C_H2 di alcuni isotipi. La regione cerniera ha dimensioni comprese tra i 10 e i 60 aminoacidi a seconda degli isotipi. Le porzioni di queste sequenze assumono una conformazione non ripiegata e flessibile che permette una torsione tra le regioni C_H1 e C_H2. Alcune delle più importanti differenze tra le regioni costanti delle sottoclassi IgG sono concentrate a livello della regione cerniera. Questo si riflette in una conformazione diversa dei vari sottotipi delle IgG. Inoltre, la flessibilità delle molecole anticorpali è dovuta alla capacità di ciascun dominio V_H di ruotare rispetto al dominio C_H1 adiacente.

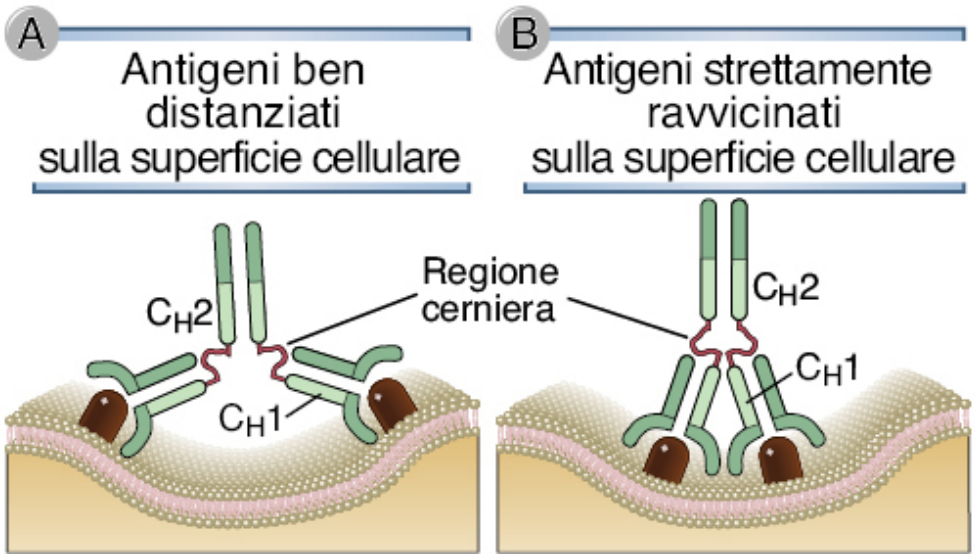


FIGURA 5-7 Flessibilità delle molecole anticorpali. I due siti di legame dell'antigene di un anticorpo in forma monomerica si legano contemporaneamente a due determinanti antigenici collocati a distanze differenti. In **A,** la molecola di Ig raffigurata si lega a due determinanti antigenici ben distanziati tra loro espressi su una membrana cellulare, mentre in **B,** lo stesso anticorpo si lega a due determinanti antigenici situati in posizione ravvicinata. Tale flessibilità è dovuta alla regione cerniera localizzata tra i domini C_H1 e C_H2, che consente il movimento dei siti combinatori in maniera indipendente dal resto della molecola.

Esistono due classi o isotipi di catene leggere, chiamate κ e λ, che si differenziano per la regione C carbossiterminale. Un anticorpo è costituito da due catene leggere κ o da due catene leggere λ, ma mai da una catena leggera di un tipo e una dell'altro. Nell'uomo, il 60% circa degli anticorpi è dotato di catene leggere κ, mentre il 40% ha catene leggere λ. Nei pazienti affetti da tumori delle cellule B si possono verificare variazioni di questo rapporto, perché le cellule neoplastiche che derivano da un unico clone B producono un solo tipo di anticorpo con la stessa catena leggera. Di conseguenza un alterato rapporto tra cellule che esprimono le catene κ e quelle che esprimono le catene λ viene spesso utilizzato come ausilio per la diagnosi dei linfomi a cellule B. Nel topo gli anticorpi contenenti catene κ sono circa 10 volte più frequenti di quelli contenenti catene λ. Diversamente dagli isotipi delle catene pesanti, non sono note differenze funzionali tra anticorpi contenenti catene κ o catene λ.

Gli anticorpi possono essere espressi in forma secreta o associata alla membrana, in base alla sequenza aminoacidica C-terminale dell'ultimo dominio della regione C_H. Nella forma secreta, che è presente nel sangue e

nei fluidi extracellulari, la porzione carbossiterminale è idrofila. La forma della membrana contiene una porzione carbossiterminale che include due segmenti: una regione àncora transmembrana idrofobica ad α elica, seguita da una regione intracellulare composta da aminoacidi carichi positivamente (Fig. 5-8) che si legano alle teste cariche negativamente dei fosfolipidi sul lato interno della membrana plasmatica stabilizzando l'ancoraggio della proteina. Nelle IgM e nelle IgD di membrana la parte citoplasmatica della catena pesante è corta, costituita solo da 3 aminoacidi; nelle IgG e IgE di membrana è invece un po' più lunga, fino a 30 aminoacidi, e include i 3 residui aminoacidici carichi positivamente.

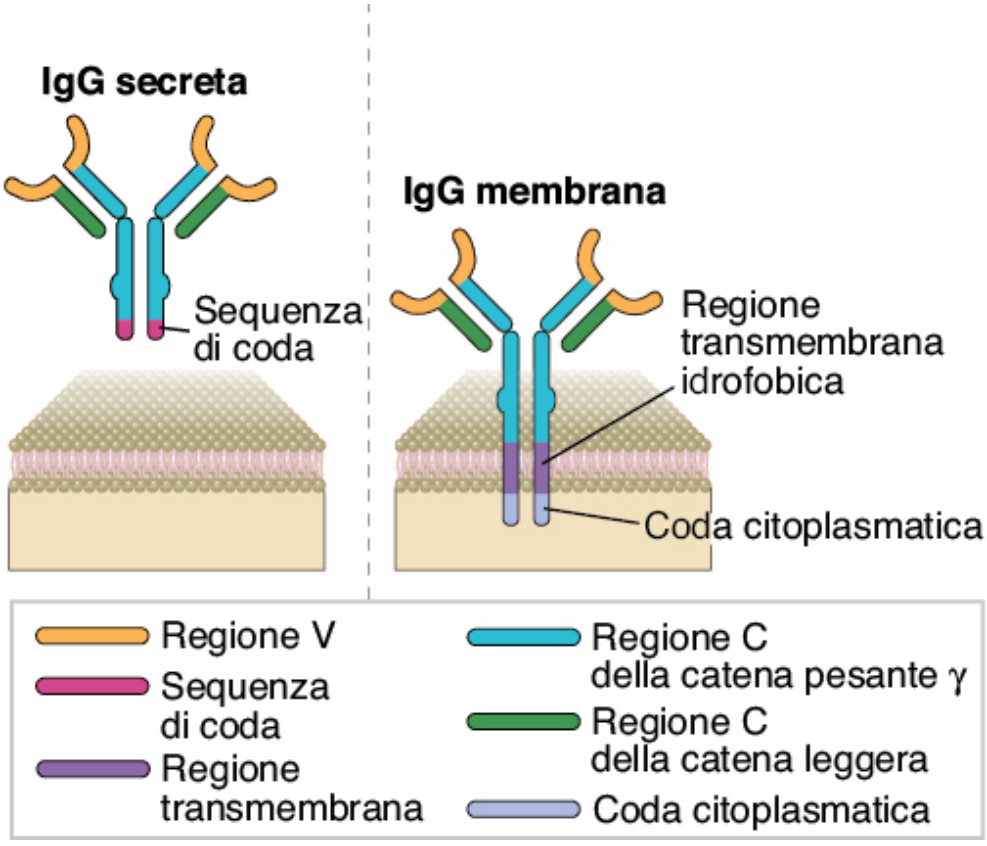


FIGURA 5-8 Forma secreta e di membrana delle catene pesanti delle Ig. La forma di membrana delle catene pesanti delle Ig, a differenza di quelle secrete, contengono una regione transmembrana composta da aminoacidi idrofobici e domini citoplasmatici che differiscono significativamente tra i diversi isotipi. La porzione citoplasmatica della forma di membrana della catena μ contiene soltanto 3 residui, mentre la regione citoplasmatica delle catene pesanti delle IgG (catena pesante γ) ne contiene 20-30. Anche la coda C-terminale delle Ig in forma secreta differisce tra i vari isotipi: μ presenta un lungo pezzo di coda (21 aminoacidi) coinvolto nella formazione dei pentameri, mentre le IgG hanno un breve pezzo di coda (3 aminoacidi).

Le IgG e le IgE secrete, così come tutte le Ig di membrana, indipendentemente dall'isotipo, sono monomeriche e sono costituite da 2 catene pesanti e da 2 catene leggere. Al contrario, le forme secrete delle IgM e delle IgA formano complessi multimerici nei quali 2 o più Ig sono legate covalentemente. Le IgM possono essere secrete come pentameri ed esameri, mentre le IgA sono spesso secrete come dimeri. Questi complessi si formano grazie alle interazioni tra regioni, definite *sequenze di coda*, posizionate all'estremità carbossiterminale delle catene pesanti μ e α (vedi Tab. 5-2). I multimeri di IgA e di IgM contengono anche un polipeptide addizionale di 15 kD, denominato catena J (dall'inglese *joining*), legato da ponti disolfuro alla sequenza di coda e deputato a stabilizzare il complesso multimerico e a trasportare i multimeri dalla parte basolaterale a quella luminale degli epiteli. Come vedremo più avanti, i complessi multimerici degli anticorpi si legano agli antigeni più avidamente delle forme monomeriche, anche se entrambi gli anticorpi contengono regioni Fab che singolarmente legano l'antigene con la stessa avidità.

Anticorpi di specie diverse differiscono tra di loro nelle regioni C e in quelle intorno alle regioni V. Perciò quando gli anticorpi di una specie sono inoculati in un'altra (per esempio, anticorpi da siero di cavallo o anticorpi monoclonali di topo iniettati nell'uomo), il ricevente li riconosce come estranei, sviluppa una risposta immunitaria e produce anticorpi soprattutto contro le regioni C degli anticorpi estranei. Questa risposta può causare una malattia, chiamata malattia da siero (vedi Cap. 19); tale fenomeno limita la possibilità di trattare i pazienti con anticorpi prodotti in un'altra specie. Come vedremo più avanti nel capitolo, molti sono stati gli sforzi fatti per superare questo problema.

Invece, anticorpi di individui che appartengono alla stessa specie presentano piccole differenze di sequenza, dovute ai polimorfismi dei geni che codificano le regioni C delle catene pesanti e di quelle leggere. Le varianti polimorfe degli individui di una specie che sono riconosciute da anticorpi vengono chiamate **allotipi** e gli anticorpi che riconoscono determinanti allotipici sono detti anticorpi antiallotipo. Le differenze tra le regioni variabili sono concentrate nelle CDR e costituiscono gli **idiotipi** degli anticorpi. Un anticorpo che riconosce alcuni punti delle CDR di un altro anticorpo viene chiamato anticorpo anti-idiotipo. Ci sono interessanti teorie che sostengono che gli anticorpi anti-idiotipo contro i propri anticorpi

costituiscano un sistema di controllo della risposta immunologica di ogni individuo, ma non ci sono abbastanza evidenze a sostegno dell'importanza di questo potenziale meccanismo di regolazione.

Anticorpi monoclonali

I tumori delle plasmacellule (mieloma o plasmocitoma), come la maggior parte dei tumori di qualsiasi origine cellulare, sono tumori monoclonali e producono quindi anticorpi dotati di una sola specificità. In molti casi la specificità dell'anticorpo prodotto è sconosciuta, per cui non si possono usare gli anticorpi del mieloma per identificare e legare le molecole di interesse. La scoperta che questi tumori producono anticorpi monoclonali ha però suggerito che fosse possibile produrre anticorpi monoclonali della specificità voluta, immortalizzando cellule singole provenienti da animali immunizzati con un antigene noto. Il metodo per produrre anticorpi omogenei o monoclonali di specificità nota fu descritto da Georges Köhler e Cesar Milstein nel 1975 e ha avuto un impatto impressionante non soltanto sulla ricerca scientifica, ma anche sulla pratica clinica. Questo metodo si basa sulla possibilità di fondere linfociti B provenienti da un animale immunizzato (in genere un topo) con una linea di cellule di mieloma immortalizzate, coltivando le cellule in condizioni tali che le cellule normali e quelle del tumore che non si sono fuse non possano sopravvivere (Fig. 5-9). Le cellule, che derivano dalla fusione cellulare, in grado di crescere in coltura, sono chiamate **ibridomi**; ogni ibridoma produce un solo tipo di Ig che deriva da un singolo clone di linfociti B dell'animale immunizzato. Gli anticorpi secreti dai diversi cloni di ibridoma vengono testati per la loro capacità di riconoscere l'antigene di interesse e il clone che produce l'anticorpo per la specificità voluta viene selezionato ed espanso. I prodotti di questi singoli cloni sono gli **anticorpi monoclonali**, ognuno dei quali è specifico per un epitopo dell'antigene utilizzato per l'immunizzazione dell'animale e per individuare i cloni di ibridomi immortalizzati secernenti gli anticorpi.

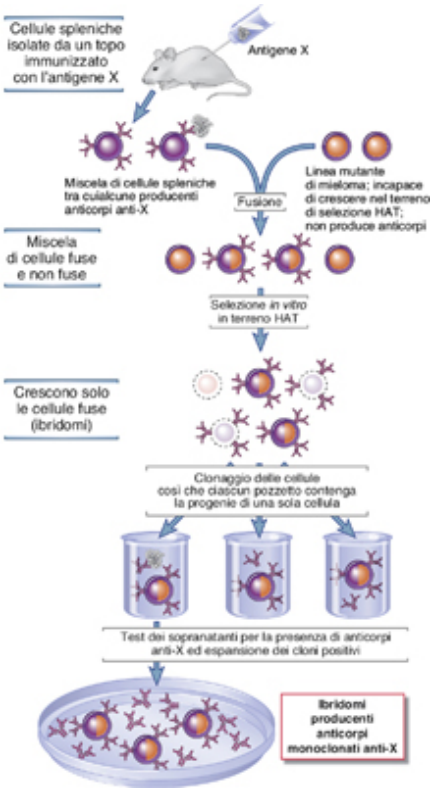


FIGURA 5-9 Generazione di anticorpi monoclonali. Con questa metodica gli splenociti di un topo immunizzato con un antigene o una miscela di antigeni vengono fusi con una linea cellulare di mieloma che manca di uno specifico enzima. La fusione avviene utilizzando reagenti chimici come il glicole polietilenico, che facilita la fusione delle membrane plasmatiche e la formazione di cellule ibride, che contengono i cromosomi di entrambi i tipi cellulari usati. Il mieloma utilizzato per la fusione non è in grado di secernere proprie Ig. Queste cellule ibride vengono poi coltivate in un terreno di selezione che permette la crescita solo alle cellule ibride immortalizzate. Dalle cellule ibride vengono selezionati cloni che derivano da una singola cellula, i quali sono successivamente testati per la produzione degli anticorpi contro l'antigene di interesse. Il terreno di selezione contiene ipoxantina, aminopterina e timidina e viene perciò chiamato terreno HAT (*Hypoxanthine, Aminopterin, Thymidine*). Nella maggior parte delle cellule ci sono due vie di sintesi delle purine, una via per la sintesi *ex novo*, che necessita di tetraidrofolato, e una di salvataggio, che utilizza l'enzima ipoxantinaguanina fosforibosiltrasferasi (*Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase*, HGPRT). Per le fusioni si usano cellule di mieloma prive di HGPRT, che normalmente sopravvivono usando la sintesi *ex novo* delle purine. In presenza di aminopterina non si forma tetraidrofolato, provocando un difetto nella sintesi *ex novo* delle purine e nella biosintesi delle pirimidine, in particolare nella formazione di TMP da dUMP. Le cellule ibride contengono HGPRT, che deriva dagli splenociti, e hanno la capacità di proliferare del mieloma. In presenza di ipoxantina e timidina nel terreno possono sintetizzare DNA in assenza di tetraidrofolato. Tutto ciò determina che solo le cellule ibride possano sopravvivere nel terreno HAT.

Gli anticorpi monoclonali hanno molte applicazioni pratiche nella ricerca, nella diagnosi e nella terapia medica. Ricordiamo qui di seguito alcune delle più comuni.

- ***Identificazione di marcatori caratteristici di un particolare tipo cellulare.*** La moderna classificazione dei linfociti e degli altri leucociti si basa sul legame di anticorpi monoclonali specifici per le diverse popolazioni. Questa analisi ha permesso di definire i gruppi di differenziazione (*Cluster of Differentiation*, marker CD) per i diversi tipi cellulari (vedi Cap. 2).
- ***Immunodiagnosi.*** Molte infezioni e malattie sistemiche vengono oggi diagnosticate sulla base della presenza di particolari antigeni, oppure di anticorpi nel sangue, nelle urine, o nei tessuti mediante l'uso di test immunologici che utilizzano anticorpi monoclonali specifici per un determinato marcatore diagnostico (vedi Appendice IV).
- ***Tipizzazione dei tumori.*** Anticorpi monoclonali marcati e specifici per particolari proteine cellulari sono utilizzati per determinare l'origine cellulare dei tumori attraverso la colorazione istologica delle biopsie tumorali.
- ***Terapia.*** La ricerca medica ha ormai identificato cellule e molecole che sono coinvolte nella patogenesi di molte malattie. Gli anticorpi monoclonali, grazie alla loro elevata specificità, permettono di colpire con grande selettività questi bersagli. Alcuni anticorpi monoclonali (Tab. 5-3) sono usati attualmente in terapia. Per esempio, vengono usati anticorpi contro il fattore di necrosi tumorale (*Tumor Necrosis Factor*, TNF) nella terapia dell'artrite reumatoide e di altre malattie infiammatorie, anticorpi contro CD20 per il trattamento delle leucemie da cellule B e per depletare i linfociti B in alcune patologie autoimmuni, anticorpi contro il recettore del fattore di crescita epidermico (*Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) nella terapia del tumore della mammella, anticorpi contro il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (*Vascolar Growth Factor Receptor*, VEGF; una citochina che promuove l'angiogenesi) in pazienti con il cancro del colon.
- ***Analisi funzionale di molecole solubili o di membrana.*** Nella ricerca biologica si utilizzano anticorpi monoclonali specifici per molecole espresse sulla superficie cellulare, tra cui i recettori per l'antigene, e si valuta se il legame dell'anticorpo alla molecola di superficie ha un effetto stimolatorio o inibitorio su particolari funzioni cellulari. Gli anticorpi monoclonali sono anche molto usati per purificare una

determinata popolazione cellulare da una miscela di cellule, per poterne studiare le caratteristiche e le funzioni.

Uno dei limiti nell'uso terapeutico degli anticorpi monoclonali deriva dalla loro origine animale, in genere dal topo. I pazienti trattati con anticorpi monoclonali di topo possono produrre anticorpi contro le Ig murine, questa risposta è chiamata *anticorpale umana antitopo* (*Human Anti-Mouse Antibody*, HAMA). Tali anticorpi anti-Ig bloccano la funzione o favoriscono l'eliminazione degli anticorpi monoclonali iniettati e possono provocare la malattia da siero (vedi Cap. 19). Per aumentare le potenzialità d'impiego degli anticorpi monoclonali sono state utilizzate tecniche di ingegneria genetica. Il cDNA che codifica per le catene polipeptidiche di un anticorpo monoclonale può essere isolato da un ibridoma e questi geni possono essere manipolati *in vitro*. Come precedentemente discusso in questo capitolo, solo piccole regioni all'interno della molecola anticorpale sono responsabili del legame con l'antigene; mentre il resto può essere considerato come un'"impalcatura". Questa organizzazione strutturale consente di inserire segmenti di DNA che codificano per la sequenza dei siti di legame con l'antigene di un anticorpo monoclonale murino all'interno di un cDNA che codifica per un'immunoglobulina umana, creando così un gene ibrido. Quando questo gene viene espresso, la proteina ibrida che ne risulta mantiene la specificità dell'anticorpo monoclonale murino, ma possiede l'"impalcatura" di un anticorpo umano e viene perciò definita anticorpo umanizzato. Gli anticorpi monoclonali umanizzati vengono ottenuti mediante la tecnologia di "phage display" oppure mediante topi transgenici dotati di linfociti B che esprimono Ig umane e in alcuni casi sono già utilizzati in clinica. Nonostante gli anticorpi umanizzati risultino meno "estranei" al sistema immunitario umano riducendo la probabilità che si generi una risposta anticorpale contro gli anticorpi murini, una parte di soggetti sottoposti a tale trattamento terapeutico sviluppa, per ragioni ancora sconosciute, anticorpi neutralizzanti.

SINTESI, ASSEMBLAGGIO ED ESPRESSIONE DEGLI ANTICORPI

Le catene pesanti e leggere delle immunoglobuline, come la maggior parte delle proteine secrete e di membrana, sono sintetizzate sui ribosomi ancorati alla membrana del reticolo endoplasmatico rugoso. La proteina trasloca poi nel reticolo endoplasmatico e le catene pesanti delle Ig sono N-glicosilate durante questo processo di traslocazione. Il corretto assemblaggio delle catene pesanti delle Ig e la loro associazione con le catene leggere sono regolati da proteine localizzate nel reticolo endoplasmatico denominate chaperonine. Tali proteine, che comprendono la calnexina e una molecola detta BiP (*Binding Protein*, ossia proteina legante), si legano ai polipeptidi delle Ig neosintetizzate e determinano il loro trattenimento nel reticolo o l'inizio della loro degradazione sulla base della loro struttura più o meno corretta. Anche l'associazione covalente tra le diverse catene, che si realizza attraverso la formazione di ponti disolfuro, fa parte del processo di assemblaggio e si verifica nel reticolo endoplasmatico. Dopo l'assemblaggio, le molecole Ig si staccano dalle chaperonine, vengono convogliate alle cisterne dell'apparato di Golgi, in cui avviene la processazione dei carboidrati, e gli anticorpi vengono poi trasportati all'interno di vescicole verso la membrana cellulare. Gli anticorpi in forma di membrana sono ancorati alla membrana plasmatica e quelli in forma secreta sono trasportati all'esterno della cellula.

TABELLA 5-3 Anticorpi monoclonali già approvati per l'utilizzo clinico

Bersaglio	Effetto	Malattia
Malattie a base infiammatoria o immunitaria		
α4 integrine	Inibizione della migrazione dei leucociti nell'intestino e il SNC	Morbo di Crohn, sclerosi multipla
BAFF	Inibizione della sopravvivenza dei linfociti B	Lupus eritematoso sistemico
CD3	Eliminazione dei linfociti T	Trapianto d'organo
CD11a	Inibizione della migrazione delle cellule infiammatorie	Psoriasi
CD20	Eliminazione dei linfociti B	Linfoma a cellule B, artrite reumatoide, sclerosi multipla, altre malattie autoimmuni
CD25 (IL-2Rα)	Inibizione della funzione dei linfociti T	Trapianto d'organo
IgE	Blocco della funzione IgE	Asma allergica

IL-6 receptor	Inibizione dell'infiammazione	Artrite reumatoide
TNF	Inibizione dell'infiammazione	Artrite reumatoide, morbo di Crohn, psoriasi
Tumori		
CD30	Eliminazione dei linfociti	Linfoma anaplastico a grandi cellule e linfoma di Hodgkin
CD33	Eliminazione delle cellule mielodi; attivazione del signaling inibitorio nelle cellule mielodi	Leucemia acuta mieloide
CD52	Eliminazione dei linfociti	Leucemia cronica linfocitica
CTLA-4	Attivazione dei linfociti T	Melanoma
EGFR	Inibizione della crescita dei tumori epiteliali	Cancro del colon-retto, polmone, testa e collo
HER2/Neu	Eliminazione delle cellule tumorali; inibizione del signaling originato da EGF	Cancro al seno
PD-1	Attivazione dei linfociti T effettori	Melanoma, carcinoma renale, altri tumori
PD-L1	Attivazione dei linfociti T effettori	Melanoma, carcinoma renale, altri tumori
VEGF	Blocco dell'angiogenesi tumorale	Tumore della mammella, tumore del colon, degenerazione maculare senile
CD20 (vedi sopra)		
Altre patologie		
C5	Inibizione della lisi mediata dal complemento	Emoglobinuria parossistica notturna, sindrome emolitico-uremica atipica
Glicoproteina IIb/IIIa	Inibizione dell'aggregazione piastrinica	Patologie cardiovascolari
Ligando Rank	Inibizione dei segnali generati da RANK	Osteoporosi post-menopausale, metastasi ossee di tumori solidi
Proteina F di RSV	inibizione dell'infezione virale	Infezione da virus respiratorio sinciziale

BAFF, famiglia del fattore di attivazione dei linfociti B; CTLA-4, antigene 4 citotossico dei linfociti T; EGFR, recettore del fattore di crescita epidermico; HER2/Neu, recettore del fattore di crescita

epidermico umano 2/Neu; PD-1, recettore *Program Death-1*; PD-L1, ligando-1 del recettore PD-1; RSV, virus respiratorio sinciziale; TNF, fattore di necrosi tumorale; VEGF, fattore di crescita endoteliale vascolare.

La maturazione dei linfociti B a partire dai precursori midollari è accompagnata da specifiche modificazioni nell'espressione dei geni delle Ig, che determinano la produzione delle diverse classi anticorpali (Fig. 5-10). Nella linea differenziativa dei linfociti B la prima cellula che produce polipeptidi delle Ig è chiamata cellula pre-B. Questa cellula sintetizza la forma di membrana della catena pesante μ. Le catene μ si associano con proteine chiamate catene leggere surrogate e formano il recettore delle cellule pre-B; una piccola parte di questo recettore viene espressa sulla superficie della cellula pre-B. I linfociti B maturi e immaturi producono catene leggere κ o λ, che si associano con le proteine μ per formare le molecole IgM. I linfociti B maturi esprimono in membrana le IgM e le IgD (le catene pesanti μ e δ associate con le catene leggere κ o λ). Queste Ig di membrana svolgono la funzione di recettori per l'antigene e danno inizio al processo di attivazione dei linfociti B. I recettori per l'antigene dei linfociti pre-B e B sono associati non covalentemente ad altre due proteine integrali di membrana, Igα e Igβ, che svolgono la funzione di trasdurre il segnale all'interno della cellula e sono essenziali per l'espressione delle IgM e delle IgD di superficie. Gli eventi molecolari e cellulari che accompagnano la maturazione dei linfociti B e che sono alla base dell'espressione degli anticorpi saranno discussi nel Capitolo 8.

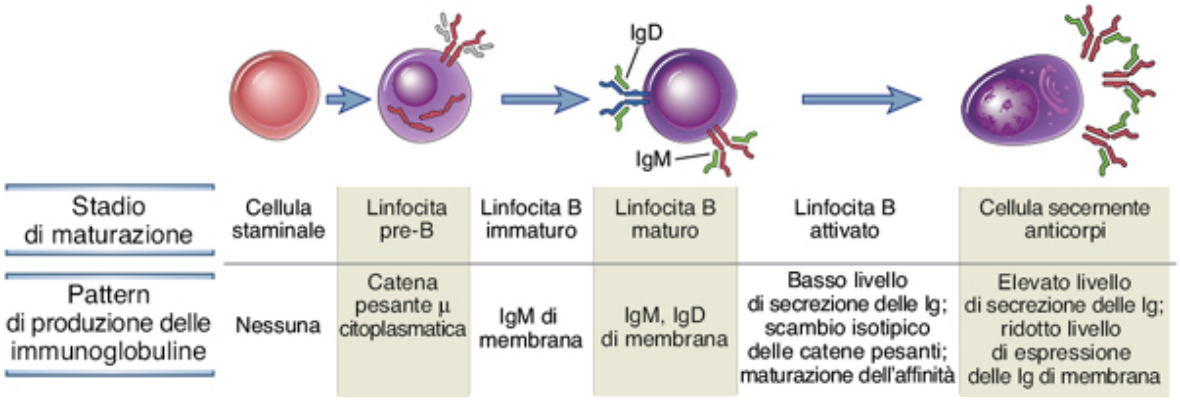


FIGURA 5-10 Espressione delle immunoglobuline durante la maturazione dei linfociti B. Gli stadi maturativi dei linfociti B sono messi in correlazione con le modificazioni nella produzione delle catene pesanti e leggere delle Ig. Le catene pesanti delle IgM sono mostrate in *rosso*, quelle delle IgD in *blu*; le catene leggere sono in *verde*. I fenomeni molecolari che accompagnano queste modificazioni vengono trattati nei Capitoli 8 e 12.

Quando i linfociti B maturi vengono attivati dagli antigeni e da altri stimoli, le cellule si differenziano in cellule secernenti anticorpi o plasmacellule. Tale processo è anche accompagnato da alterazioni nella produzione delle Ig. Una di queste alterazioni è l'aumento della produzione della forma secreta rispetto alla forma di membrana. Questa alterazione avviene a livello post-trascrizionale. Una seconda alterazione è costituita dall'espressione di isotipi della catena pesante diversi dalle IgM e dalle IgD, chiamata switching isotipico delle catene pesanti (o scambio di classe). I cambiamenti dell'espressione di anticorpi che si verificano dopo l'attivazione dei linfociti B saranno discussi più approfonditamente nel Capitolo 12.

Emivita degli anticorpi

L'emivita degli anticorpi circolanti si misura come tempo medio necessario affinché la concentrazione ematica si riduca della metà. L'emivita fornisce quindi una misura di quanto a lungo gli anticorpi permangono nel sangue dopo la loro secrezione da parte dei linfociti B (o dopo la loro iniezione nel caso di una somministrazione a scopo profilattico o terapeutico). La vita media degli anticorpi circolanti varia a seconda dell'isotipo anticorpale. Per le IgE è di circa 2 giorni (anche se le IgE legate ai recettori ad alta affinità dei mastociti hanno un'emivita molto lunga; vedi Cap. 20). Per le IgA è di circa 3 giorni e per le IgM di circa 4 giorni. Per le IgG, invece, è di 21-28 giorni.

Si pensa che la lunga emivita delle IgG sia dovuta al fatto che esse si legano a un particolare FcR, detto **recettore Fc neonatale** (*Neonatal Fc Receptor*, FcRn), che è anche coinvolto nel trasporto delle IgG materne all'intestino del neonato attraverso la placenta. FcRn ha una struttura simile alle molecole MHC di classe I (vedi Cap. 6) e nella placenta e nell'intestino del neonato trasporta le molecole IgG attraverso le cellule preservandole dall'ingresso nei lisosomi. Nei vertebrati adulti FcRn si trova sulla superficie delle cellule endoteliali dei macrofagi e di altri tipi cellulari dove esso lega le IgG entrate nella cellula per micropinocitosi a livello degli endosomi. FcRn impedisce alle IgG legate di dirigersi verso i lisosomi, riciclandole invece sulla superficie cellulare dove le rilascia a pH neutro, restituendole al circolo (Fig. 5-11). Questo riciclo intracellulare delle IgG impedisce che esse entrino nei lisosomi dove andrebbero incontro a rapida degradazione, così come avviene per la maggior parte delle altre proteine sieriche, inclusi altri isotipi anticorpali; conseguentemente le IgG hanno una vita media relativamente

lunga. Esistono comunque differenze significative nei valori di emivita delle quattro sottoclassi di IgG umane. Le IgG3 hanno una vita relativamente breve poiché si legano debolmente a FcRn. Le IgG1 e le IgG2 sono invece le più longeve e quindi le più efficienti in termini di funzioni effettrici (vedi Cap. 13). Questa caratteristica è stata sfruttata in terapia producendo proteine iniettabili che contengono la parte biologicamente attiva di una proteina di interesse e la porzione Fc dell'IgG. La porzione Fc consente alla proteina di fusione di legarsi a FcRn, allungandone l'emivita e quindi l'efficienza terapeutica. Una di queste proteine di fusione, importante in ambito terapeutico, è TNFR-Ig ottenuta attraverso la fusione del dominio extracellulare del recettore di tipo II per il TNF con un dominio Fc dell'IgG. Questa proteina chimerica viene usata nella terapia di alcune malattie autoimmuni, come l'artrite reumatoide e la psoriasi, dove blocca l'attività infiammatoria del TNF. Un'altra proteina di fusione è CTLA4-Ig, che contiene il dominio extracellulare del recettore CTLA4 (che si lega alle molecole costimolatorie B7, vedi Fig. 9-7) fuso con la porzione Fc delle IgG umane; anche questa proteina è utilizzata nel trattamento dell'artrite reumatoide e più in generale come agente immunosoppressore.

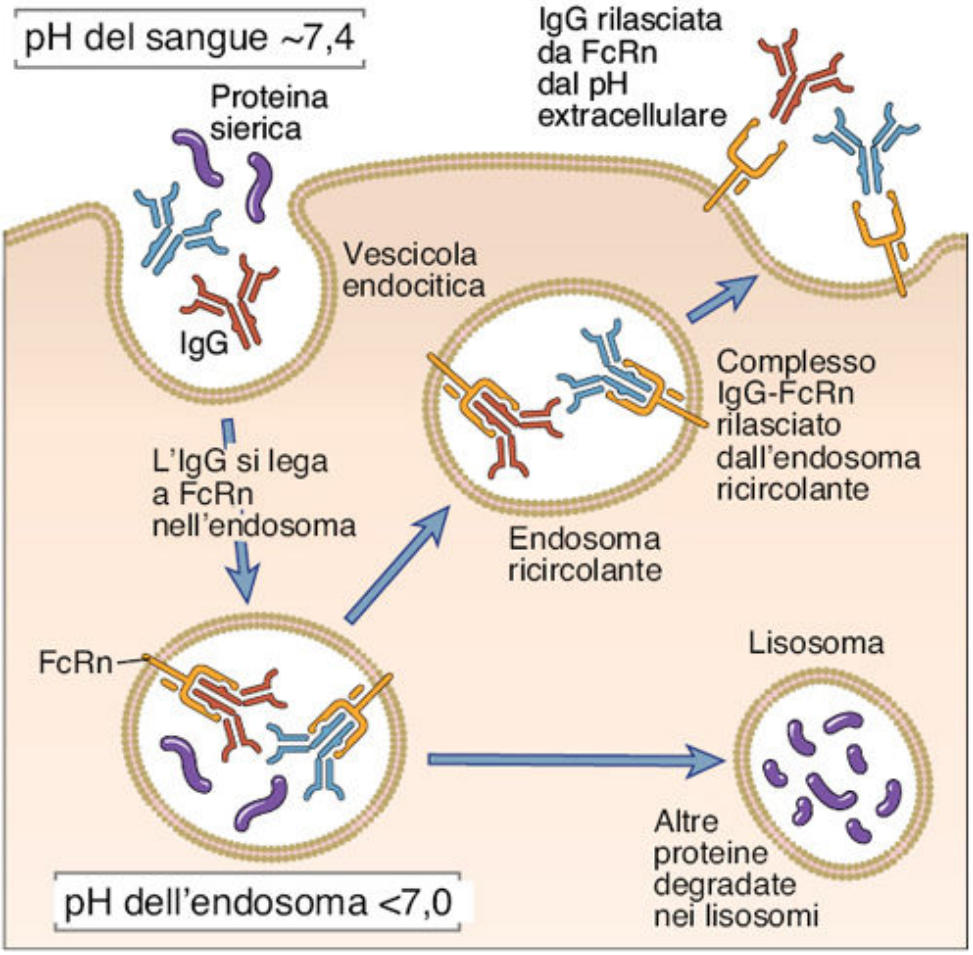


FIGURA 5-11 FcRn contribuisce a prolungare l'emivita delle IgG. Le molecole IgG, entrate nella cellula endoteliale per micropinocitosi, legano l'FcRn, un recettore per le IgG, nel microambiente acido endosomiale. Nelle cellule endoteliali FcRn indirizza le molecole IgG lontano dai lisosomi e dalla conseguente degradazione e le rilascia quando gli endosomi si fondono con la superficie cellulare, rilasciando i complessi FcRn-IgG in un ambiente a pH neutro.

LEGAME DEGLI ANTICORPI AGLI ANTIGENI

Tutte le funzioni degli anticorpi dipendono dalla loro capacità di legare gli antigeni in modo specifico. Consideriamo ora la natura degli antigeni e come questi vengono riconosciuti dagli anticorpi.

Caratteristiche degli antigeni di interesse biologico

Un antigene è una sostanza che può legarsi in modo specifico a un anticorpo o a un recettore dei linfociti T. Gli anticorpi possono riconoscere

come antigeni praticamente ogni tipo di molecola biologica: semplici metaboliti, zuccheri, lipidi e ormoni, nonché macromolecole, come carboidrati complessi, fosfolipidi, acidi nucleici e proteine; al contrario, i linfociti T riconoscono soprattutto peptidi (vedi Cap. 6).

Anche se tutti gli antigeni sono riconosciuti da linfociti o da anticorpi specifici, solo alcuni antigeni sono in grado di attivare i linfociti. Le molecole che innescano una risposta immunitaria sono definite **immunogeni**. Le macromolecole riescono a stimolare efficacemente i linfociti B a iniziare una risposta umorale, dal momento che l'attivazione dei linfociti B richiede l'aggregazione (*cross-linking*) di più recettori per l'antigene. I composti chimici di piccole dimensioni, come il dinitrofenolo, possono legarsi agli anticorpi, ma non sono di per sé in grado di attivare le cellule B (cioè non sono immunogeni). Affinché si generino anticorpi specifici per queste piccole molecole è necessario che l'immunizzazione venga effettuata utilizzando questi antigeni coniugati a macromolecole. La molecola chimica di piccole dimensioni è definita **aptene**, mentre la macromolecola è chiamata **carrier**. Il complesso aptene-carrier, a differenza dell'aptene da solo, può agire come immunogeno (vedi Cap. 12).

Generalmente le macromolecole, come le proteine, i polisaccaridi e gli acidi nucleici, sono di dimensioni maggiori rispetto a quelle della regione di legame dell'anticorpo (vedi (Fig. 5-6). Di conseguenza, ciascun anticorpo si lega solo a una porzione della macromolecola, che viene definita **determinante** o **epitopo**. Questi due termini sono sinonimi e saranno usati in modo intercambiabile in questo testo. Le macromolecole contengono solitamente molteplici determinanti, alcuni dei quali possono essere ripetuti, e ognuno di essi è in grado di legarsi a un anticorpo. La presenza di più determinanti identici in uno stesso antigene è definito **polivalenza** oppure **multivalenza**. La maggior parte delle proteine globulari non contiene determinanti identici ripetuti e non sono quindi polivalenti, a meno che non siano in forma aggregata. I polisaccaridi e gli acidi nucleici possono invece contenere, a intervalli regolari, numerosi epitopi identici: queste molecole sono quindi definite polivalenti. La superficie delle cellule, compresi i microbi, presenta spesso un assetto polivalente con determinanti antigenici proteici o glucidici. Antigeni polivalenti sono in grado di indurre l'aggregazione dei recettori e l'attivazione dei linfociti B (vedi Cap. 7).

La disposizione spaziale dei vari epitopi di una singola molecola può influenzare in diversi modi il legame degli anticorpi. Quando i determinanti sono ben separati, due o più molecole anticorpali possono legarsi a uno stesso antigene proteico senza influenzarsi a vicenda; questi determinanti sono detti non sovrapposti. Quando invece i due determinanti sono vicini, il legame di un anticorpo al primo determinante può causare un'interferenza sterica con il legame dell'altro anticorpo al secondo epitopo; questi determinanti sono pertanto definiti *sovrapposti*. In casi più rari, il legame del primo anticorpo può causare un cambiamento conformazionale nella struttura dell'antigene, influenzando così il legame del secondo anticorpo attraverso un fenomeno diverso dall'impedimento sterico. Questa interazione è denominata *effetto allosterico*.

Ogni forma o superficie disponibile su una molecola che può essere riconosciuta da un anticorpo costituisce un determinante antigenico. I determinanti antigenici si possono ritrovare su qualsiasi tipo di composto, quali i carboidrati, le proteine, i lipidi e gli acidi nucleici. Nel caso delle proteine, la formazione di alcuni determinanti dipende soltanto dalla struttura primaria, mentre in altri casi è coinvolta la struttura terziaria o conformazionale (Fig. 5-12). Gli epitopi formati da una sequenza di residui aminoacidici sono chiamati **determinanti lineari**. Di solito il sito di legame di un anticorpo può alloggiare un determinante lineare dell'antigene composto da circa 6 aminoacidi. I determinanti lineari sono accessibili agli anticorpi se compaiono sulla superficie esterna dell'antigene o in una regione che si estende al di fuori della proteina nativa ripiegata. In altri casi i determinanti lineari sono inaccessibili nella conformazione nativa della proteina e appaiono solo quando la proteina è denaturata. I **determinanti conformazionali** sono invece costituiti da residui aminoacidici non disposti in sequenza e si formano per giustapposizione spaziale, dovuta al ripiegamento della proteina, di regioni distanziate tra loro. Per accertare se una proteina è denaturata o se si trova nella conformazione nativa si possono usare anticorpi specifici per determinanti lineari o per determinanti conformazionali. Le proteine possono andare incontro a modifiche quali la glicosilazione, la fosforilazione, l'ubiquitinazione, l'acetilazione e la proteolisi. Tali modifiche, alterando la struttura della proteina, possono produrre nuovi epitopi. Tali epitopi sono chiamati **determinanti neoantigenici** e anch'essi possono essere riconosciuti da anticorpi specifici.

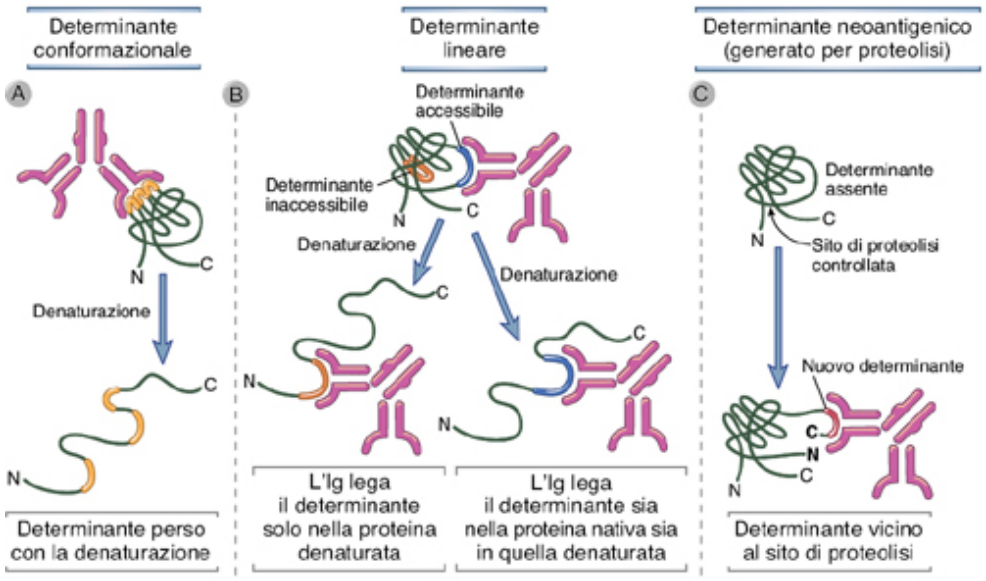


FIGURA 5-12 Natura dei determinanti antigenici. I determinanti antigenici (in *arancione*, *rosso* e *blu*) possono dipendere dal ripiegamento della proteina (conformazione) come pure dalla struttura primaria. Alcuni determinanti sono accessibili nella proteina nativa e persi con la denaturazione della stessa (**A**), mentre altri vengono esposti solo su proteine non ripiegate (**B**). I neodeterminanti nascono da modificazioni della struttura covalente, come la rottura di legami peptidici (**C**).

Basi strutturali e chimiche del legame con gli antigeni

Nella maggior parte degli anticorpi, il sito di legame per l'antigene è costituito da una superficie planare che può alloggiare gli epitopi conformazionali delle macromolecole (vedi Fig. 5-6). Le 6 CDR, 3 della catena pesante e 3 della catena leggera, possono allargarsi formando un'ampia superficie. In alcuni casi, come nel legame di molecole di piccole dimensioni, quali i monosaccaridi e i farmaci, l'antigene viene legato in una tasca formata dai domini V_L e V_H delle regioni CDR contrapposte.

Il riconoscimento dell'antigene da parte dell'anticorpo è costituito da legami non covalenti di tipo reversibile. Il legame dell'antigene all'anticorpo è costituito da vari tipi di interazioni non covalenti, quali forze elettrostatiche, legami a idrogeno, forze di van der Waals, e da interazioni idrofobiche. Il contributo relativo di ciascuna di queste interazioni dipende sia dalla struttura del singolo anticorpo sia da quella del determinante antigenico. La forza di legame tra il sito combinatorio di un anticorpo e l'epitopo di un antigene è chiamata **affinità** dell'anticorpo. L'affinità è solitamente espressa come costante di dissociazione (K_d), che indica quanto sia facile separare il complesso antigene-anticorpo. Una K_d bassa indica una maggiore affinità,

poiché significa che è necessaria una concentrazione minore di antigene e di anticorpo per formare il complesso. La K_d degli anticorpi prodotti nel corso delle risposte immunitarie umorali varia generalmente tra 10^{-7} M e 10^{-11} M. Il siero di un individuo immunizzato contiene una miscela di anticorpi dotati di una diversa affinità per l'antigene, a seconda delle sequenze delle regioni CDR.

Poiché la regione cerniera conferisce agli anticorpi una certa flessibilità, una singola molecola può legarsi a un antigene polivalente con più di un sito combinatorio. Per le IgG o le IgE, tale legame può interessare, al massimo, due siti combinatori, uno per ognuno dei Fab. Per le IgM pentameriche, invece, un singolo anticorpo può legare fino a 10 differenti epitopi (Fig. 5-13). Gli antigeni polivalenti possiedono multipli determinanti antigenici; sebbene l'affinità di ciascun sito combinatorio sia uguale, la forza di legame dell'anticorpo all'antigene deriva dal legame di tutti i siti combinatori con tutti gli epitopi disponibili sull'antigene polivalente. Tale forza complessiva di legame prende il nome di **avidità** ed è maggiore dell'affinità di un singolo sito combinatorio. Così, una molecola IgM a bassa affinità può legarsi con grande forza a un antigene polivalente, poiché molte interazioni a bassa affinità (fino a 10 per una molecola IgM) possono produrre un'interazione complessiva ad avidità elevata.

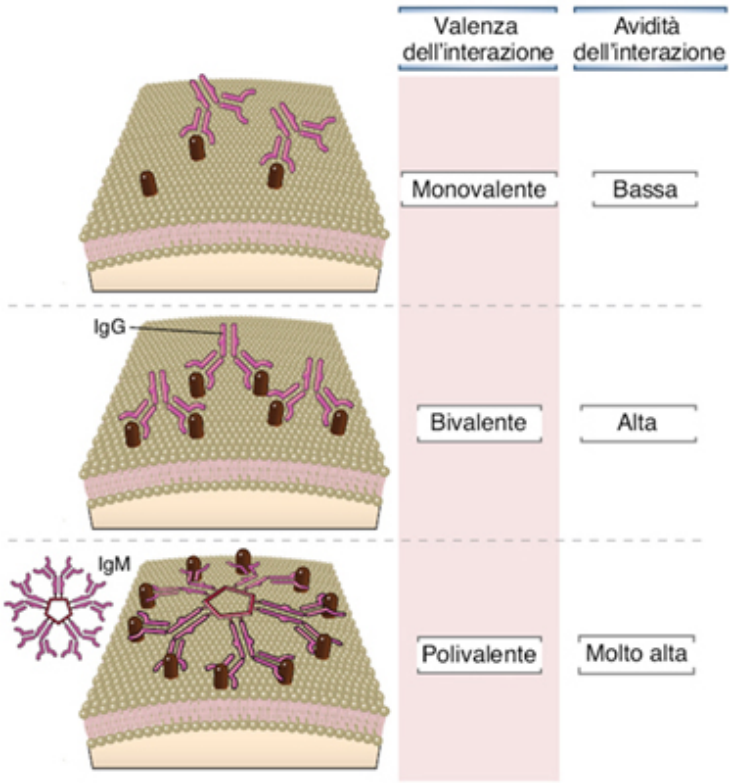


FIGURA 5-13 Valenza e avidità dell'interazione antigene-anticorpo. Gli antigeni monovalenti o gli epitopi separati sulla superficie cellulare interagiscono con un solo sito combinatorio di una molecola anticorpale. Nonostante l'affinità di questa interazione possa essere alta, il valore complessivo di avidità è relativamente basso. Se i determinanti ripetuti sono espressi in maniera abbastanza ravvicinata sulla superficie di una cellula, possono legare entrambi i siti di legame di una IgG mediante un'interazione bivalente ad avidità maggiore. La regione cerniera delle IgG permette la modificazione strutturale necessaria per impegnare entrambi i siti di legame. Le molecole IgM possiedono dieci siti combinatori identici, che possono teoricamente legarsi simultaneamente a epitopi identici ripetuti sulla superficie di una cellula; l'interazione che ne risulterà sarà polivalente e ad avidità molto elevata.

Come abbiamo già visto precedentemente, gli antigeni polivalenti sono importanti per l'attivazione dei linfociti B. L'interazione polivalente tra antigene e anticorpo ha un preciso significato biologico, infatti molte funzioni effettrici svolte dagli anticorpi vengono innescate in maniera ottimale solo quando due o più molecole anticorpali sono strettamente ravvicinate in seguito al legame di un antigene polivalente. Se un antigene polivalente viene messo in una provetta con un anticorpo specifico, le due componenti si associano a formare un **immunocomplesso** (Fig. 5-14). A una data concentrazione, chiamata zona di equivalenza, l'antigene e l'anticorpo formano un esteso e fittissimo reticolo molecolare, in cui la maggior parte, o la totalità, delle molecole di antigene e di anticorpo è complessata. Gli

immunocomplessi possono essere dissociati in aggregati più piccoli o aumentando la concentrazione dell'antigene in modo che le molecole di antigene libero spiazzino quelle legate all'anticorpo (zona di eccesso di antigene) o aumentando la concentrazione dell'anticorpo, così che l'anticorpo libero spiazzi quello legato dai determinanti antigenici (zona di eccesso di anticorpo). Se la zona di equivalenza viene raggiunta *in vivo*, possono formarsi in circolo immunocomplessi di grosse dimensioni. Gli immunocomplessi che restano intrappolati o che si formano a livello di un tessuto possono scatenare reazioni infiammatorie, definite malattie da immunocomplessi (vedi Cap. 19).

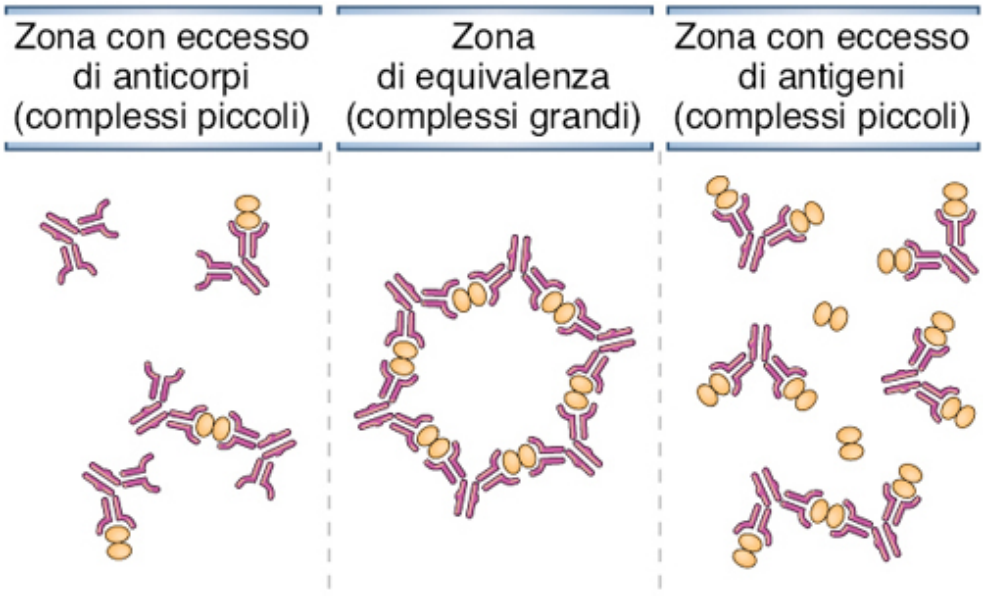


FIGURA 5-14 Complessi antigene-anticorpo. Le dimensioni dei complessi antigene-anticorpo (immuni) sono funzione della concentrazione relativa dell'antigene e dell'anticorpo. I complessi voluminosi si formano a una concentrazione di antigeni multivalenti e di anticorpi detta zona di equivalenza; i complessi sono più piccoli in caso di relativo eccesso di antigene o di anticorpo.

RAPPORTO FRA STRUTTURA E FUNZIONE NELLE MOLECOLE ANTICORPALI

Molte delle caratteristiche strutturali degli anticorpi sono critiche per la loro capacità di riconoscere antigeni ed esplicare le funzioni effettrici. In questo

paragrafo sono riassunte le caratteristiche strutturali coinvolte nelle funzioni degli anticorpi.

Caratteristiche correlate al riconoscimento dell'antigene

Gli anticorpi riconoscono in modo specifico un'ampia varietà di antigeni sulla base delle proprietà delle regioni V.

Specificità

Gli anticorpi sono estremamente specifici per gli antigeni, essendo in grado di distinguere minime differenze nella loro struttura chimica. Esperimenti eseguiti all'inizio del ventesimo secolo dimostrarono che gli anticorpi prodotti in risposta all'aminobenzene con un gruppo sulfonato in posizione "meta" si legavano fortemente a questo aptene, mentre non si legavano affatto o si legavano in maniera molto debole agli isomeri dell'aminobenzene che si differenziavano da esso per la sostituzione del gruppo sulfonato in posizione "para" oppure "orto". Questi antigeni sono strutturalmente molto simili e differiscono solo nella localizzazione del gruppo sulfonato sull'anello benzenico.

La spiccata specificità degli anticorpi si applica al riconoscimento di tutte le classi di molecole. Per esempio, gli anticorpi possono distinguere tra due determinanti lineari proteici che differiscono soltanto per una sostituzione aminoacidica, che ha poco effetto sulla struttura secondaria della proteina. Questo alto grado di specificità è necessario per evitare che gli anticorpi generati verso alcune componenti microbiche reagiscano con molecole self strutturalmente simili o con antigeni di altre specie microbiche. Alcuni anticorpi prodotti contro un determinato antigene possono tuttavia legarsi anche a un antigene diverso, strutturalmente correlato. Questo fenomeno è definito **cross-reattività**. Talvolta anticorpi prodotti in risposta a un antigene microbico cross-reagiscono con antigeni autologhi e questo fenomeno può determinare l'insorgenza di malattie immunitarie (vedi Cap. 19).

Diversificazione

Come abbiamo detto precedentemente, un individuo è capace di generare un numero enorme (nell'ordine di milioni) di anticorpi strutturalmente differenti,

ciascuno dotato di una distinta specificità. La presenza di un elevato numero di anticorpi che si legano ad antigeni differenti è detta **diversificazione** e l'insieme complessivo degli anticorpi con differenti specificità è detto **repertorio anticorpale**. I meccanismi genetici che determinano un repertorio anticorpale così grande sono operativi esclusivamente nei linfociti. Il meccanismo fondamentale alla base di questo fenomeno è la ricombinazione casuale di una serie limitata di sequenze di DNA presenti nella linea germinativa per formare geni funzionali che codificano le regioni V delle catene pesanti e leggere, nonché l'aggiunta di sequenze nucleotidiche durante il processo di ricombinazione. Questi meccanismi saranno discussi in dettaglio nel Capitolo 8. Le infinite varianti delle regioni ipervariabili, che legano gli antigeni, delle catene pesanti e leggere che ne derivano costituiscono la base della specificità per l'antigene.

Maturazione dell'affinità

La capacità degli anticorpi di neutralizzare le tossine e i microrganismi patogeni dipende dalla potenza di legame dell'anticorpo. Come già descritto, questo legame si realizza attraverso interazioni ad alta affinità e ad alta avidità. Nel corso delle risposte umorali ad antigeni proteici T-dipendenti, si generano anticorpi a elevata affinità mediante un meccanismo che si basa su piccole modificazioni nella struttura delle regioni V. Queste modificazioni avvengono nei linfociti B stimolati dall'antigene mediante un processo di mutazione somatica che produce nuovi domini V, alcuni dei quali capaci di legare l'antigene con maggiore affinità rispetto ai domini V originari (Fig. 5-15). I linfociti B che producono anticorpi ad affinità più elevata hanno un vantaggio selettivo e diventano la popolazione dominante nelle successive esposizioni allo stesso antigene. Questo processo, denominato **maturazione dell'affinità**, si traduce in un aumento dell'affinità media degli anticorpi via via che la risposta umorale si sviluppa. Per esempio, se un anticorpo prodotto durante la risposta primaria verso un antigene proteico ha una K_d di 10^{-7}-10^{-9} M, nel corso della risposta secondaria la sua affinità aumenterà, raggiungendo una K_d di 10^{-11} M o anche inferiore. I meccanismi responsabili della maturazione dell'affinità saranno discussi nel Capitolo 12.

Caratteristiche correlate alle funzioni effettrici

Molte funzioni effettrici delle Ig sono mediate dalla porzione Fc e gli isotipi anticorpali che differiscono in tale regione svolgono funzioni distinte. Si è già accennato al fatto che le funzioni effettrici degli anticorpi dipendono dal legame delle regioni C delle catene pesanti, che costituiscono la porzione Fc, ad altre cellule o a proteine plasmatiche. Per esempio, le IgG che rivestono un microbo ne facilitano la fagocitosi da parte dei neutrofili e dei macrofagi. Questo avviene perché le molecole delle IgG complessate all'antigene sono in grado di legarsi, tramite i loro frammenti Fc, ai FcR espressi sulla superficie di queste cellule. Le IgE legano invece i mastociti che esprimono gli FcR specifici per le IgE e ne inducono la degranulazione. Un altro meccanismo effettore dell'immunità umorale che dipende dalla regione Fc è l'attivazione della via classica del sistema del complemento. Il sistema del complemento genera mediatori proinfiammatori e promuove la fagocitosi e la lisi dei microbi. L'attivazione del complemento è innescata dal legame di una proteina chiamata C1q alla porzione Fc delle IgG o delle IgM complessate con un antigene. I siti di legame delle Ig da parte di FcR e del complemento sono situati in corrispondenza dei domini C delle catene pesanti dei diversi isotipi di immunoglobuline (vedi Fig. 5-1). La struttura e la funzione degli FcR e delle proteine del complemento verranno trattate nel Capitolo 13.

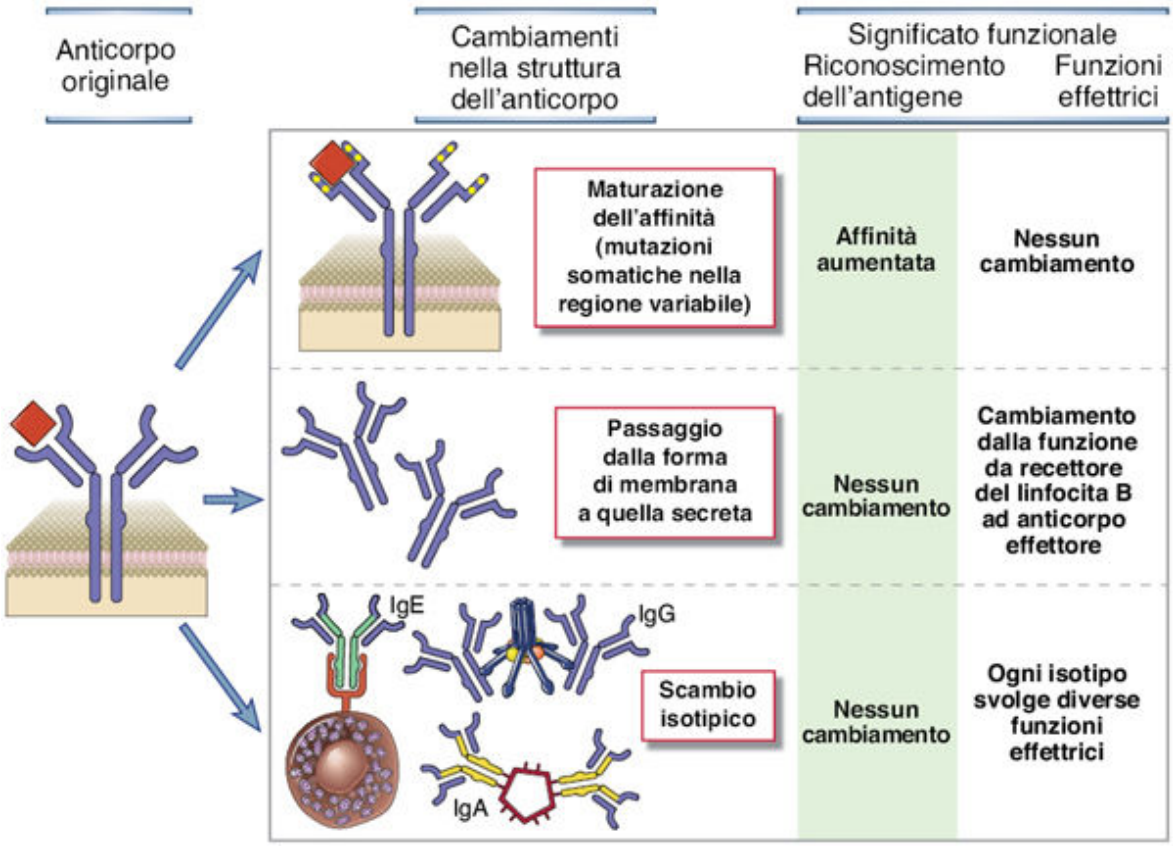


FIGURA 5-15 Modificazioni nella struttura anticorpale durante la risposta umorale. L'illustrazione mostra i cambiamenti nella struttura a cui possono andare incontro gli anticorpi prodotti dalla progenie di linfociti B attivati (un singolo clone) e i relativi adattamenti funzionali. Durante la maturazione dell'affinità, le mutazioni nella regione variabile (V) (indicate dai punti *gialli*) affinano la specificità anticorpale senza che si verifichino modificazioni nelle funzioni effettrici che dipendono dalla regione costante (C). I linfociti B passano dalla produzione di molecole anticorpali in gran parte di membrana, dotate di un dominio transmembrana e di un dominio citoplasmatico, alla produzione di anticorpi in forma secreta. Gli anticorpi secreti possono o non possono mostrare mutazioni dei geni V (cioè la secrezione degli anticorpi può avvenire sia prima che dopo la maturazione dell'affinità). A seguito dello scambio isotipico, la regione C si modifica (come indicato dal cambiamento del colore dal *porpora* al *verde* o al *giallo*) senza alcuna modifica a carico della regione V. Lo scambio isotipico si osserva sia negli anticorpi di membrana sia in quelli secreti. Le basi molecolari di questi cambiamenti saranno trattate nel Capitolo 12.

Le funzioni effettrici degli anticorpi sono innescate soltanto da Ig che hanno legato un antigene e non dagli anticorpi liberi. I sistemi effettori dell'immunità umorale, come le proteine del complemento e gli FcR dei fagociti, possono essere attivati solo dalla porzione Fc di due o più anticorpi vicini (vedi Cap. 13). La necessità di avere almeno due molecole anticorpali unite "a ponte" fa sì che le funzioni effettrici siano rivolte in maniera

specifica verso gli antigeni riconosciuti dagli anticorpi. Al contrario, gli anticorpi circolanti liberi non sono in grado di scatenare risposte immuni.

Le modificazioni dell'isotipo degli anticorpi nel corso delle risposte umorali condizionano il modo in cui l'antigene viene eliminato nell'ambito della risposta umorale. Un singolo clone di linfociti B può produrre anticorpi di diverso isotipo, ma dotati degli stessi domini V e quindi di identica specificità. I linfocit B naïve esprimono contemporaneamente IgM e IgD, provviste di uno stesso sito combinatorio, che servono da recettori di membrana. Quando queste cellule sono attivate da antigeni, prevalentemente di origine microbica, possono andare incontro a un processo denominato ***switching*** (o **scambio**) **isotipico** (o **di classe**), in cui varia la regione C_H e quindi l'isotipo anticorpale espresso, mentre la regione V e quindi la specificità non si modificano (vedi Fig. 5-15). Quindi in seguito allo scambio isotipico, la progenie del linfocita B che originariamente esprimeva IgM e IgD può produrre altri isotipi e sottotipi di Ig più efficienti nell'eliminazione dell'antigene. Per esempio, la risposta anticorpale a molti batteri e virus è governata dalle IgG, che promuovono la fagocitosi dei microbi, mentre la risposta agli elminti è mediata principalmente dalle IgE, che intervengono nell'uccisione dei parassiti. Lo scambio isotipico a IgG prolunga anche l'efficacia della risposta umorale, dal momento che le IgG hanno un'emivita più lunga. I meccanismi e il significato funzionale dello switching isotipico verranno discussi nel Capitolo 12.

Le regioni C delle catene pesanti degli anticorpi condizionano anche la loro distribuzione tissutale. Come abbiamo già detto, i linfociti B dopo essere stati attivati perdono gradualmente l'espressione degli anticorpi di membrana ed esprimono anticorpi nella forma secreta (vedi Fig. 5-15). Le IgA possono essere secrete efficacemente attraverso gli epiteli mucosali e sono quindi la classe anticorpale maggiormente rappresentata a livello delle secrezioni mucose e del latte (vedi Cap. 14). I neonati sono protetti dalle infezioni grazie alle IgG acquisite dalla madre attraverso la placenta durante la gestazione e subito dopo la nascita attraverso l'intestino. Questo trasferimento è mediato da FcRn, che è stato precedentemente descritto come ilrecettore responsabile della prolungata emivita delle IgG.

RIEPILOGO

* Gli anticorpi o immunoglobuline sono una famiglia di glicoproteine strutturalmente correlate, prodotte dai linfociti B in forma secreta o legata alla membrana.
* Gli anticorpi espressi sulla membrana servono da recettori per l'antigene e causano l'attivazione dei linfociti B.
* Gli anticorpi secreti fungono da mediatori dell'immunità umorale specifica e innescano diversi meccanismi effettori molecolari e cellulari per eliminare l'antigene a cui sono legati.
* Le regioni delle molecole anticorpali che legano l'antigene mostrano un'altissima variabilità e un individuo può produrre milioni di diversi anticorpi, ciascuno dotato di una sua specificità, differente da quella di tutte le altre immunoglobuline.
* Tutti gli anticorpi sono costituiti da una struttura simmetrica comune, costituita da due catene pesanti identiche legate covalentemente tra loro e da due catene leggere, anch'esse identiche tra loro, ciascuna delle quali lega covalentemente una delle due catene pesanti. Ogni catena è formata da domini immunoglobulinici di circa 110 aminoacidi che contengono sequenze conservate e ponti disolfuro intracatena.
* I domini aminoterminali delle catene pesanti e leggere formano le regioni variabili (V) degli anticorpi, che caratterizzano la diversa specificità degli anticorpi. Ciascuna regione V delle catene leggere e pesanti contiene tre regioni ipervariabili di circa 10 aminoacidi, assemblate spazialmente per formare il sito combinatorio per l'antigene.
* Gli anticorpi sono classificati in differenti isotipi (o classi) e sottotipi sulla base di differenze presenti nella regione costante (C) delle catene pesanti. Queste regioni sono composte da 3 o 4 domini immunoglobulinici e possiedono caratteristiche funzionali diverse. Le classi anticorpali sono denominate IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Entrambe le catene leggere di una singola molecola Ig appartengono a uno stesso isotipo, κ o λ; i due isotipi differiscono per la struttura del loro unico dominio C.
* La maggior parte delle funzioni effettrici degli anticorpi è mediata dalle regioni C delle catene pesanti, ma queste funzioni sono innescate dal legame dell'antigene ai siti combinatori della regione V.
* Gli anticorpi monoclonali sono prodotti da un singolo clone di linfociti B e riconoscono un solo determinante dell'antigene. Gli anticorpi monoclonali possono essere prodotti in laboratorio e sono molto usati nella ricerca, nella diagnostica e nella terapia.
* Gli antigeni sono sostanze che si legano in modo specifico agli anticorpi o ai recettori per l'antigene dei linfociti T. Gli antigeni che si legano agli anticorpi comprendono un'ampia varietà di molecole d'interesse biologico, quali lipidi, carboidrati, proteine e acidi nucleici. Per contro, il recettore per l'antigene dei linfociti T riconosce soltanto peptidi di natura proteica.
* La porzione della macromolecola che è riconosciuta da un anticorpo è detta aptene o determinante dell'antigene. Gli antigeni macromolecolari contengono epitopi o determinanti multipli, ciascuno dei quali può essere riconosciuto da un anticorpo. Gli epitopi lineari degli antigeni proteici sono formati da una sequenza di aminoacidi adiacenti, mentre i determinanti conformazionali sono formati dal ripiegamento della catena polipeptidica.
* L'affinità dell'interazione tra il sito combinatorio di una singola molecola anticorpale e un singolo epitopo è rappresentata dalla costante di dissociazione (K_d), calcolata sulla base della forza di legame antigene-anticorpo. Gli antigeni polivalenti contengono epitopi identici ripetuti, a cui possono legarsi molecole anticorpali identiche. Gli anticorpi possono legarsi simultaneamente a 2 o, nel caso delle IgM, fino a 10 epitopi identici, con conseguente aumento dell'avidità dell'interazione antigene-anticorpo.

* La concentrazione relativa di un antigene polivalente e dell'anticorpo specifico può favorire la formazione di immunocomplessi che possono depositarsi e danneggiare i tessuti.
* Il legame di un anticorpo all'antigene è in genere altamente specifico, riuscendo a distinguere minime differenze nella struttura chimica, tuttavia si possono verificare casi di cross-reattività, per cui due o più antigeni strutturalmente simili possono essere riconosciuti da uno stesso anticorpo.
* Nel corso di una risposta immunitaria possono succedersi molte trasformazioni nella struttura degli anticorpi prodotti da un clone di linfociti B. Inizialmente, questo è in grado di produrre solo Ig di membrana ma, una volta attivato e differenziato in plasmacellula, esso acquisisce la capacità di secernere anche Ig dotate della stessa specificità del recettore Ig di membrana originario. Una modificazione nell'uso dei segmenti genici per la regione C, senza variazioni a carico della regione V, è alla base del cosiddetto scambio isotipico, che comporta una modifica delle funzioni effettrici senza però alterare la specificità dell'anticorpo. Mutazioni puntiformi delle regioni V di un anticorpo specifico per un dato antigene portano a un aumento dell'affinità verso quello stesso antigene (maturazione dell'affinità).

LETTURE CONSIGLIATE

Struttura e funzione degli anticorpi

Corti D.; Lanzavecchia A: Broadly neutralizing antiviral antibodies. *Annual Review of Immunology* 31:705–742 (2013).

Danilova N.; Amemiya C.T: Going adap tive: the saga of antibodies. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1168:130–155 (2009).

Fagarasan S: Evolution, development, mechanism and function of IgA in the gut. *Current Opinion in Immunology* 20:170–177 (2008).

Law M.; Hengartner L: Antibodies against viruses: passive and active immunization. *Current Opinion in Immunology* 20:486–492 (2008).

Uso terapeutico degli anticorpi

Chan A.C.; Carter P.J: Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 10:301–316 (2010).

Kohler G.; Milstein C: Continuous culture of fused cells secreting antibody of predetermined specificity. *Nature* 256:495–497 (1975).

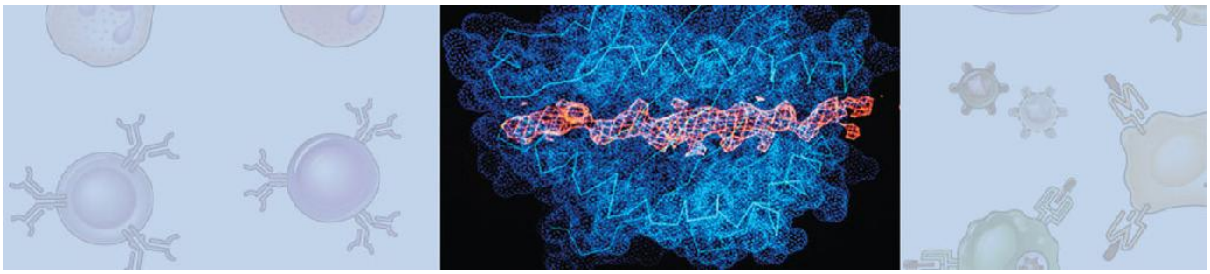
Lonberg N: Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms. *Current Opinion in Immunology* 20:450–459 (2008).

Weiner L.M.; Surana R.; Wang S: Mono clonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 10:317–327 (2010).

Wilson P.C.; Andrews S.F: Tools to t herapeutically harness the human antibody response. *Nature Reviews Immunology* 12:709–719 (2012).

CAPITOLO

6



Complesso maggiore di istocompatibilità e presentazione dell’antigene ai linfociti T

CARATTERISTICHE DEGLI ANTIGENI RICONOSCIUTI DAI LINFOCITI T

CATTURA DELL’ANTIGENE E FUNZIONI DELLE CELLULE CHE PRESENTANO L’ANTIGENE

Ruolo delle cellule dendritiche nella cattura e nella presentazione dell’antigene

Funzioni di altre cellule che presentano l’antigene

COMPLESSO MAGGIORE DI ISTOCOMPATIBILITÀ

Scoperta dell’MHC

Geni MHC

Molecole MHC

Legame dei peptidi alle molecole MHC

PROCESSAZIONE DEGLI ANTIGENI PROTEICI

MHC di classe I, processazione e presentazione delle proteine citosoliche

MHC di classe II, processazione e presentazione delle proteine contenute nelle vescicole endocitiche

Cross-presentazione

Significato fisiologico della presentazione dell’antigene in associazione all’MHC

PRESENTAZIONE DEGLI ANTIGENI NON PROTEICI A SOTTOPOPOLAZIONI DI CELLULE T

RIEPILOGO

La principale funzione dei linfociti T è l’eliminazione dei microrganismi intracellulari e l’attivazione di altre cellule, come i macrofagi e i linfociti B. Per svolgere queste funzioni i linfociti T devono superare diverse sfide.

- Il numero dei linfociti T naïve specifici per un determinato antigene è estremamente ridotto; queste poche cellule devono essere in grado di individuare l’antigene ed eliminarlo. I microbi e gli antigeni possono trovarsi virtualmente in ogni parte del corpo e questo rende impossibile per i pochi linfociti T specifici ilcontrollo costante di tutti i possibili tessuti in cui gli antigeni potrebbero penetrare o riprodursi. Per raggiungere questo scopo è necessario un sistema specializzato che catturi l’antigene e lo trasporti agli organi linfoidi in cui ricircolano i linfociti T e dove possono avere inizio le risposte. Le cellule specializzate nella cattura e presentazione dell’antigene e nell’attivazione dei linfociti T sono

chiamate **cellule che presentano l'antigene** (*Antigen Presenting Cells*, **APC**).

- Le funzioni della maggior parte dei linfociti richiedono che essi interagiscano con altre cellule, che possono essere cellule dendritiche, macrofagi, linfociti B o qualsiasi cellula dell'ospite che sia stata infettata. Per essere sicuri che i linfociti T interagiscano con cellule e non con antigeni solubili, il recettore per l'antigene è strutturato in modo da permettere l'interazione solo con gli antigeni legati a molecole presenti sulla superficie delle cellule e non direttamente con gli antigeni presenti sulla superficie dei microbi, o quelli presenti in circolo, oppure nei fluidi extracellulari. Questa caratteristica differenzia i linfociti T dai linfociti B, i quali sono invece in grado di riconoscere antigeni espressi sulla superficie dei microbi, antigeni solubili e antigeni associati alle cellule, attraverso il recettore per l'antigene e gli anticorpi secreti. Il riconoscimento degli antigeni associati alle cellule dell'ospite da parte dei linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$ avviene attraverso proteine specializzate, chiamate molecole del **complesso maggiore di istocompatibilità** (*Major Histocompatibility Complex*, **MHC**), espresse sulla superficie delle cellule dell'ospite.
- I diversi tipi di linfociti T devono essere capaci di rispondere agli antigeni microbici presenti in differenti compartimenti cellulari. Per esempio, la difesa contro i virus presenti in circolo è affidata agli anticorpi e la produzione di anticorpi sempre più efficienti necessita dell'intervento dei linfociti T helper $CD4^+$; tuttavia, se lo stesso virus infetta cellule di un tessuto, il virus diventa inaccessibile agli anticorpi e per la sua eliminazione è necessario l'intervento dei linfociti T $CD8^+$ citotossici (*Cytotoxic T Lynphocytes*, CTL), che uccidono le cellule infettate ed eliminano gli accumuli dell'agente infettante. Questa dicotomia deriva dal diverso comportamento che le APC hanno nei confronti di antigeni che provengono da compartimenti extracellulari o intracellulari e dalla presentazione di questi antigeni a diversi tipi di linfociti T. Le molecole MHC svolgono un ruolo critico nel discriminare gli antigeni extracellulari da quelli intracellulari e nel presentarli a differenti popolazioni di linfociti T.

Quindi, la cattura e la presentazione dell'antigene ai linfociti T è un processo altamente specializzato ed essenziale per dare il via al tipo di risposta ottimale

dei linfociti T. La comprensione delle diverse componenti biologiche e molecolari di questa complessa sequenza di eventi costituisce un risultato eccezionale che è stato raggiunto grazie a studi che hanno affrontato i diversi aspetti funzionali, biochimici e strutturali di tale processo. In questo capitolo descriveremo i meccanismi di cattura e presentazione degli antigeni ai linfociti T. Nel Capitolo 7, verrà descritto il recettore per l'antigene dei linfociti T e nei Capitoli 9, 10 e 11 si parlerà dell'attivazione dei linfociti T e delle loro funzioni effettrici.

CARATTERISTICHE DEGLI ANTIGENI RICONOSCIUTI DAI LINFOCITI T

Quello che oggi è noto riguardo il riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti T è il risultato di un imponente lavoro iniziato con lo studio della natura degli antigeni che stimolano l'immunità cellulo-mediata. Questi esperimenti hanno dimostrato che le forme fisico-chimiche degli antigeni riconosciuti dai linfociti T sono diverse da quelle riconosciute dai linfociti B e dagli anticorpi, e i risultati di queste ricerche hanno portato alla scoperta di come gli antigeni possano essere riconosciuti dai linfociti T. Le modalità di riconoscimento degli antigeni da parte dei linfociti T sono uniche (Tab. 6-1).

TABELLA 6-1 Caratteristiche del riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti T

Caratteristiche degli antigeni riconosciuti dai linfociti T	Spiegazione
La maggior parte dei linfociti T riconosce i peptidi e non altre molecole	Solamente i peptidi si legano alle molecole MHC
I linfociti T riconoscono solo peptidi lineari e non i determinanti conformazionali degli antigeni proteici	I peptidi lineari si legano alle tasche delle molecole MHC e la conformazione delle proteine viene persa durante la generazione di tali peptidi
I linfociti T riconoscono gli antigeni associati alle cellule e non gli antigeni solubili	La maggioranza dei recettori dei linfociti T riconosce solo complessi peptide-MHC, e le molecole MHC sono proteine di membrana che espongono sulla superficie cellulare peptidi legati stabilmente
I linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$ riconoscono in modo	Le vie di assemblaggio delle molecole MHC assicurano che le molecole di classe II presentino preferenzialmente peptidi che derivano da proteine extracellulari che sono state inglobate nelle vescicole delle

preferenziale antigeni provenienti rispettivamente dai compartimenti vescicolare e citosolico	APC e che le molecole di classe I presentino peptidi derivati da proteine citosoliche; le molecole CD4 e CD8 legano, rispettivamente, regioni non polimorfe delle molecole MHC di classe II e I

La maggior parte dei linfociti T riconosce soltanto peptidi corti, mentre i linfociti B possono riconoscere peptidi, proteine, acidi nucleici, carboidrati, lipidi e composti chimici di piccole dimensioni. Di conseguenza, le risposte immunitarie mediate dai linfociti T sono di solito attivate da antigeni non-self di natura proteica (la sorgente naturale dei peptidi), mentre le risposte immunitarie umorali vengono attivate da antigeni proteici e da antigeni di origine non proteica. Alcuni linfociti T sono specifici per piccoli composti chimici, come il dinitrofenolo, l'urushioldell'edera velenosa, i β-lattamici delle penicilline e perfino il nichel. In questo caso, è probabile che questi composti chimici, chiamati apteni, si leghino alle proteine self, incluse le molecole MHC, e che i linfociti T riconoscano i peptidi coniugati o con l'aptene o con le molecole MHC alterate. I linfociti $CD4^+$ e $CD8^+$ riconoscono di regola antigeni peptidici, anche se, come si vedrà più avanti in questo capitolo, ci sono alcune popolazioni di linfociti T, numericamente limitate, in grado di riconoscere anche antigeni non proteici.

I recettori per l'antigene dei linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$ sono specifici per antigeni peptidici che siano presentati dalle molecole MHC (Fig. 6-1). Il recettore dei linfociti T (*T Cell Receptor*, TCR) si è evoluto per riconoscere in modo specifico le molecole MHC, la cui normale funzione è di presentare i peptidi. Come vedremo nel Capitolo 8, il riconoscimento delle molecole MHC è altresì richiesto per la maturazione dei linfociti $CD4^+$ e $CD8^+$ e questo garantisce che tutti i linfociti T maturi siano "ristretti" al riconoscimento dei complessi MHC-peptide. Le molecole MHC possono legare e presentare esclusivamente i peptidi e nessun'altra struttura chimica; questa è la ragione per cui la maggior parte dei linfociti T riconosce solo i peptidi. Come vedremo in seguito, le molecole MHC sono altamente polimorfe e le variazioni delle molecole MHC dei diversi individui influiscono sia sul legame del peptide sia sul riconoscimento da parte dei linfociti T. Ogni singolo linfocita T riconosce uno specifico peptide presentato da una sola delle numerose molecole MHC che possono esistere. Questo fenomeno viene chiamato **restrizione per MHC**; più avanti nel capitolo ne descriveremo le basi molecolari.

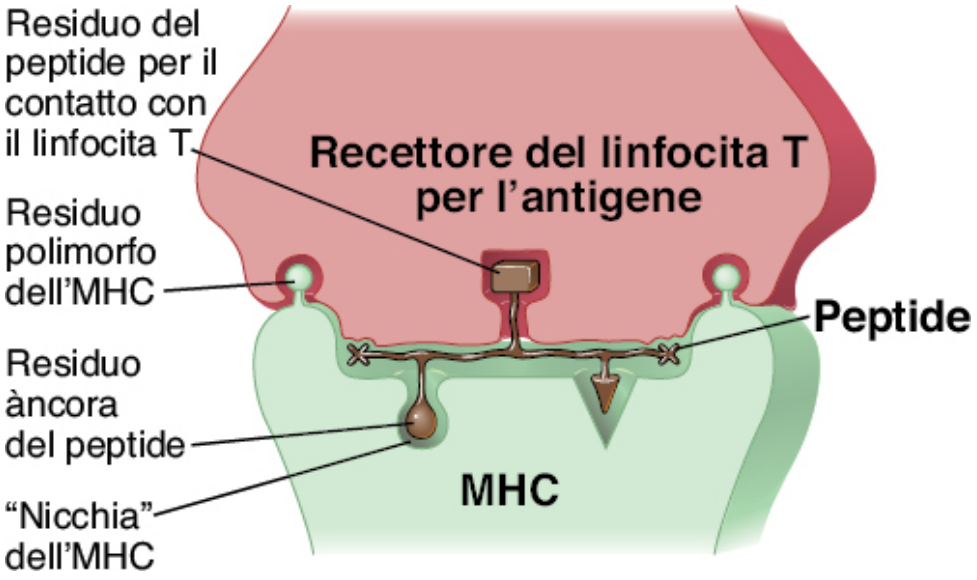


FIGURA 6-1 Riconoscimento del complesso peptide-MHC da parte di un linfocita T. Questa illustrazione mostra schematicamente una molecola MHC che lega e presenta un peptide e un recettore del linfocita T che riconosce due residui polimorfi della molecola MHC e un residuo del peptide.

Iniziamo la nostra discussione sulla presentazione dell'antigene descrivendo il modo in cui le APC catturano gli antigeni e li trasportano ai linfociti T.

CATTURA DELL'ANTIGENE E FUNZIONI DELLE CELLULE CHE PRESENTANO L'ANTIGENE

Il riconoscimento del ruolo svolto da svariati tipi cellulari nella presentazione dell'antigene ai linfociti T si basa su studi in cui antigeni proteici, noti per la loro capacità di attivare una risposta T, sono stati marcati e successivamente inoculati *in vivo* in modelli animali, al fine di individuare la natura delle cellule in grado di legarli (e quindi di riconoscerli). Si è così scoperto che gli antigeni iniettati erano associati principalmente a cellule di origine non-linfoide, il che fu sorprendente, visto che era noto che le cellule che rispondevano a questi antigeni erano i linfociti. Studi successivi hanno messo in evidenza che gli antigeni associati ai macrofagi sono, su base molare, molto più immunogenici degli stessi antigeni iniettati nei topi in forma solubile. In questi studi iniziali, è verosimile che la popolazione di macrofagi utilizzata

contenesse cellule dendritiche che, come vedremo più avanti, sono le più efficienti cellule in grado di attivare i linfociti T naïve. Altri esperimenti condotti *in vitro* hanno messo in evidenza come i linfociti T $CD4^+$ purificati non possono direttamente rispondere ad antigeni proteici, ma invece rispondono molto bene in presenza di cellule diverse dai linfociti T, come le cellule dendritiche o i macrofagi. Questi studi hanno definito il concetto che la presentazione dell'antigene ai linfociti T da parte di cellule di origine non linfoide rappresenta un evento critico nell'attivazione della risposta T; per questa ragione le cellule necessarie per l'attivazione delle risposte T sono state chiamate *cellule che presentano l'antigene*. I macrofagi sono state le prime cellule a essere identificate come APC in grado di indurre l'attivazione dei linfociti T $CD4^+$ helper. Presto è stato chiaro che molte altre popolazioni cellulari, descritte di seguito, possono svolgere la funzione di APC in situazioni diverse. Per convenzione il termine APC viene oggi usato per indicare le cellule specializzate a presentare l'antigene ai linfociti T $CD4^+$; come vedremo più avanti in questo capitolo, tutte le cellule nucleate possono presentare antigeni proteici ai linfociti T $CD8^+$, ma non tutte sono chiamate APC.

Cominciamo con la discussione di alcune delle caratteristiche generali delle APC per i linfociti T $CD4^+$.

- ***Diversi tipi di cellule possono funzionare da APC per l'attivazione dei linfociti T naïve e delle cellule T effettrici già differenziate*** (Fig. 6-2 e Tab. 6-2). Le DC sono le APC più efficaci nell'attivare i linfociti T naïve e nel dare inizio alle risposte T. Anche i macrofagi e i linfociti B possono funzionare come APC, ma prevalentemente per linfociti T $CD4^+$ helper già attivati. Il loro ruolo come APC è descritto più avanti in questo capitolo e più dettagliatamente nei Capitoli 10 e 12. Le DC, i macrofagi e i linfociti B esprimono molecole MHC di classe II e altre molecole coinvolte nella stimolazione dei linfociti T e sono perciò capaci di attivare i linfociti T $CD4^+$. Per questo motivo queste tre popolazioni cellulari sono state chiamate *APC professionali*; tuttavia, questo termine viene a volte utilizzato per riferirsi esclusivamente alle DC dato che queste sono le uniche a essere specializzate nella cattura e nella presentazione dell'antigene e le uniche APC in grado di dare inizio a una risposta primaria dei linfociti T.

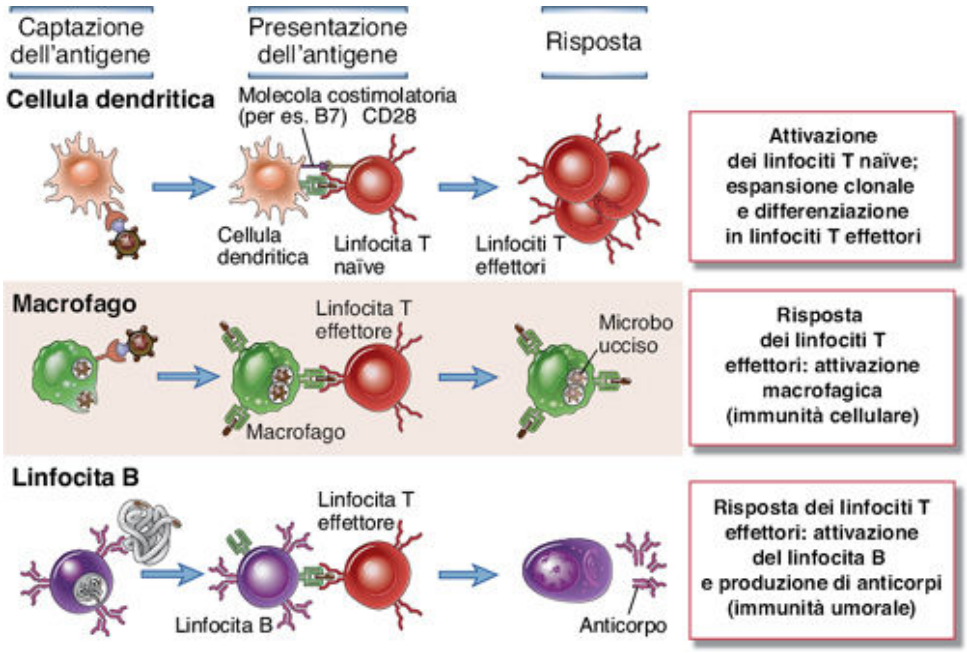


FIGURA 6-2 Funzioni delle cellule che presentano l'antigene. I tre principali tipi di cellule che presentano l'antigene ai linfociti T $CD4^+$ hanno la funzione di presentare gli antigeni in differenti momenti e nel corso di diversi tipi di risposta immunitaria. Si noti che i linfociti T effettori attivano i macrofagi e i linfociti B mediante la produzione di citochine e l'espressione di molecole di superficie; questo sarà descritto nei prossimi capitoli.

TABELLA 6-2 Proprietà e funzioni delle cellule che presentano l'antigene

Tipo cellulare	Espressione di		Funzione principale
	MHC di classe II	Molecole costimolatorie	
Cellule dendritiche	Costitutiva; aumenta con la maturazione; aumentata da IFN- γ	Costitutiva; l'espressione è aumentata dall'ingaggio di TLR, IFN- γ e dall'interazione CD40-CD40L	Inizio delle risposte dei linfociti T agli antigeni proteici (priming)
Macrofagi	Bassa o nulla; aumentata da IFN- γ	L'espressione è aumentata dall'ingaggio di TLR, IFN- γ e dall'interazione CD40-CD40L	Fase effettrice delle risposte immunitarie cellulari (potenziamento dell'azione microbicida dei fagociti)
Linfociti B	Costitutiva; aumentata da IL-4	L'espressione è aumentata dai	Presentazione dell'antigene ai

		linfociti T (interazione CD40-CD40L) e dal cross-linking dei recettori per l'antigene	linfociti T helper $CD4^+$ nelle risposte umorali (interazioni linfociti T helper-B)
Cellule endoteliali vascolari	Inducibile da IFN-γ; costitutiva nell'uomo	Bassa; forse inducibile nel topo	Possono promuovere l'attivazione dei linfociti T antigene-specifici nel sito di esposizione dell'antigene
Cellule epiteliali e mesenchimali di vario tipo	Inducibile da IFN-γ	Probabilmente nessuna	Nessuna funzione fisiologica nota; possibile ruolo nelle malattie infiammatorie
IFN-γ, interferone-γ; IL-4, interleuchina-4; LPS, lipopolisaccaride.			

- ***Le APC espongono i complessi MHC-peptide in presenza di ulteriori stimoli necessari per la completa attivazione dei linfociti T.*** Dal momento che l'antigene rappresenta il primo segnale, questi stimoli addizionali vengono a volte chiamati *secondi segnali*. I secondi segnali sono più importanti per l'attivazione dei linfociti T naïve, piuttosto che per le cellule effettrici e della memoria, già precedentemente attivate. Le molecole di membrana delle APC che attivano i linfociti T sono chiamati **costimolatori** (o **molecole costimolatorie**), perché agiscono insieme all'antigene nella stimolazione dei linfociti T. Le APC secernono anche citochine che svolgono un ruolo critico nella differenziazione dei linfociti T in cellule effettrici. Le molecole costimolatorie e le citochine saranno descritte nei Capitoli 9 e 10.
- ***La funzione di presentazione dell'antigene da parte delle APC è potenziata dalla concomitante presenza di prodotti di origine microbica.*** Questa è la ragione per cui il sistema immunitario risponde meglio ai microbi rispetto ad altre sostanze di origine non microbica. Le DC e i macrofagi esprimono i recettori Toll-like e altri sensori (vedi Cap. 4) i quali, dopo aver legato i microbi, inviano alla cellula segnali di attivazione che provocano l'aumento dell'espressione delle molecole

MHC e delle molecole costimolatorie, aumentando l'efficienza della presentazione dell'antigene; inoltre, l'ingaggio dei recettori Toll-like attiva le APC anche a produrre citochine che stimolano le risposte dei linfociti T. Le DC attivate dal riconoscimento dei microbi iniziano a esprimere recettori per le chemochine, che ne inducono la migrazione ai siti dove sono presenti i linfociti T. L'attivazione di una risposta T ottimale verso antigeni proteici purificati richiede la concomitante somministrazione di sostanze definite **adiuvanti**. Gli adiuvanti sono prodotti di origine microbica, come i micobatteri uccisi, usati sperimentalmente, o sostanze che mimano l'azione dei microbi e inducono l'aumento dell'espressione delle molecole costimolatorie, delle citochine e delle funzioni di presentazione delle APC.

- ***Le APC che presentano gli antigeni ai linfociti T ricevono, dai linfociti stessi, segnali che favoriscono le loro funzioni.*** In particolare, i linfociti T $CD4^+$, attivati dal riconoscimento dell'antigene e dalle molecole costimolatorie, esprimono molecole di superficie (tra cui il ligando di CD40 [CD154] che lega la proteina CD40 espressa dalle DC e dai macrofagi) e secernono citochine come l'interferone-γ (IFN-γ), che agisce sulle cellule che esprimono recettori specifici per questa citochina, quali le APC. La combinazione dei segnali inviati attraverso CD40 e le citochine attiva le APC, che potenziano la loro capacità di processare e presentare gli antigeni, aumentano l'espressione delle molecole costimolatorie e la secrezione di citochine che attivano i linfociti T. L'interazione bidirezionale delle APC, che presentano l'antigene, e dei linfociti T, che riconoscono l'antigene, costituisce un meccanismo di potenziamento e di ottimizzazione della risposta immunitaria (vedi Cap. 9).

Ruolo delle cellule dendritiche nella cattura e nella presentazione dell'antigene

Le risposte primarie dei linfociti T naïve iniziano negli organi linfoidi secondari, dove i microbi e gli antigeni proteici vengono trasportati dopo essere stati captati nel punto in cui sono entrati nell'organismo (Fig. 6-3). Le vie principali di ingresso degli antigeni, come i microbi, sono la cute e gli epiteli del sistema gastrointestinale e di quello respiratorio. Inoltre, gli antigeni microbici possono essere prodotti in tutti i tessuti infettati da microbi. La cute,

gli epiteli mucosi e gli organi parenchimatosi possiedono numerosi capillari linfatici, che drenano la linfa da questi siti e convogliano gli antigeni verso i linfonodi regionali. Alcuni antigeni sono trasportati nella linfa dalle APC (prevalentemente DC) che hanno catturato l'antigene e sono entrate nei vasi linfatici, mentre altri entrano nel torrente linfatico in forma libera. La linfa quindi contiene un campionario degli antigeni solubili e particolati presenti nei tessuti di provenienza. Gli antigeni si concentrano nei linfonodi, che sono localizzati lungo la rete linfatica e che si comportano come filtri, setacciando la linfa prima che essa raggiunga il sangue (vedi Cap. 2). Gli antigeni presenti nel circolo ematico possono essere "campionati" in modo analogo dalla milza.

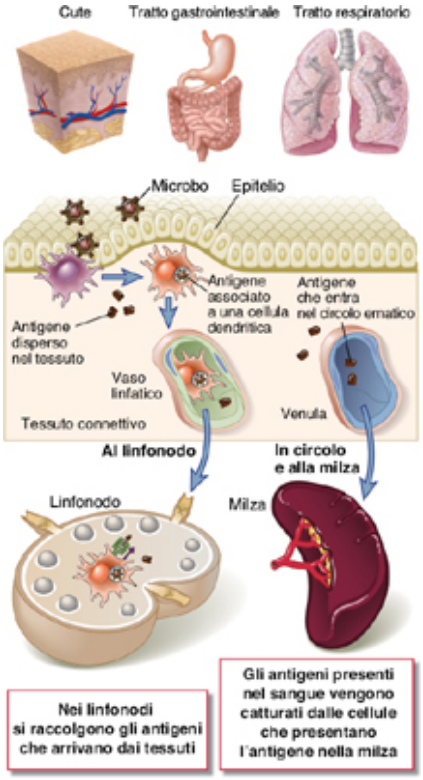


FIGURA 6-3 Vie di ingresso degli antigeni. Gli antigeni microbici penetrano generalmente attraverso la cute e i tratti gastrointestinale e respiratorio, dove sono catturati dalle cellule dendritiche e trasportati ai linfonodi regionali. Gli antigeni che entrano nel circolo ematico sono catturati dalle cellule che presentano l'antigene nella milza.

Le DC sono le cellule specializzate nella cattura, nel trasporto e nella presentazione degli antigeni ai linfociti T. Descriveremo adesso le loro caratteristiche e le loro funzioni principali, necessarie per dare inizio alla risposta T.

Morfologia e sottopopolazioni delle cellule dendritiche

Le cellule dendritiche furono inizialmente scoperte nella milza del topo come una popolazione caratterizzata da proiezioni membranose ed estroflessioni simili ai dendriti dei neuroni (Fig. 6-4). Queste cellule sono presenti nella maggior parte dei tessuti e sono particolarmente abbondanti negli organi linfoidi e in quelli che si interfacciano con l'ambiente esterno, come la pelle e il tratto gastrointestinale e respiratorio. Si pensa oggi che la maggior parte delle cellule dendritiche abbia origine da precursori midollari, ad eccezione delle cellule di *Langerhans* della cute, che si sviluppano da precursori embrionali che colonizzano la pelle prima della nascita (vedi Fig. 2-4). Oggi sappiamo che esistono due popolazioni principali di cellule dendritiche che differiscono tra loro per le caratteristiche fenotipiche e le funzioni (Tab. 6-3).

TABELLA 6-3 Le principali sottopopolazioni di cellule dendritiche

Caratteristica	DC classiche (convenzionali)		DC plasmacitoidi
	Principali	Cross-presentazione	
Marker di membrana	BDCA-1$^+$ CD1c$^+$ (uomo) CD11c$^+$ CD11b$^+$ (topo)	BDCA-3/CD141$^+$, CLEC9A$^+$ (uomo) CD11c$^+$, CD8$^+$ nel timo, CD103$^+$ nei tessuti periferici (topo)	BDCA-2/CD303$^+$ (uomo) CD11c e CD11b basso o negativo B220$^+$ (topo)
TLR	Elevati livelli di TLR2, 3, 4, 5, 8, 9	TLR3, 11	Elevati livelli di TLR7, 9
Principali citochine prodotte	IL-12, IL-23, TNF, IL-6	IL-12, IL-23, TNF, IL-6	IFN di tipo I
Principali funzioni ipotizzate	Immunità innata: produzione citochine infiammatorie. Immunità adattativa: cattura e presentazione degli antigeni principalmente ai linfociti T CD4$^+$	Immunità adattativa: cattura e cross-presentazione degli antigeni ai linfociti T CD8$^+$	Immunità anti-virale: risposta innata precoce; priming dei linfociti T antivirali
Sono stati descritti altri sottotipi di cellule dendritiche sulla base dell'espressione di vari marcatori o della migrazione da siti tissutali (le cellule di Langerhans dagli epiteli e le cellule dendritiche interstiziali dai tessuti). Si noti che tutte le cellule DC esprimono molecole MHC di classe II. Le cellule dendritiche derivate dai monociti, che possono generarsi dai monociti circolanti coltivati *in vitro* con diverse citochine, esprimono CD14 e DC-SIGN, si distinguono dai sottotipi descritti precedentemente, e possono svilupparsi *in vivo* durante le reazioni infiammatorie. Tutti i tipi di cellule dendritiche non			

attivate possono presentare antigeni self e servono a mantenere la tollerenza self; questa funzione non è elencata in tabella.

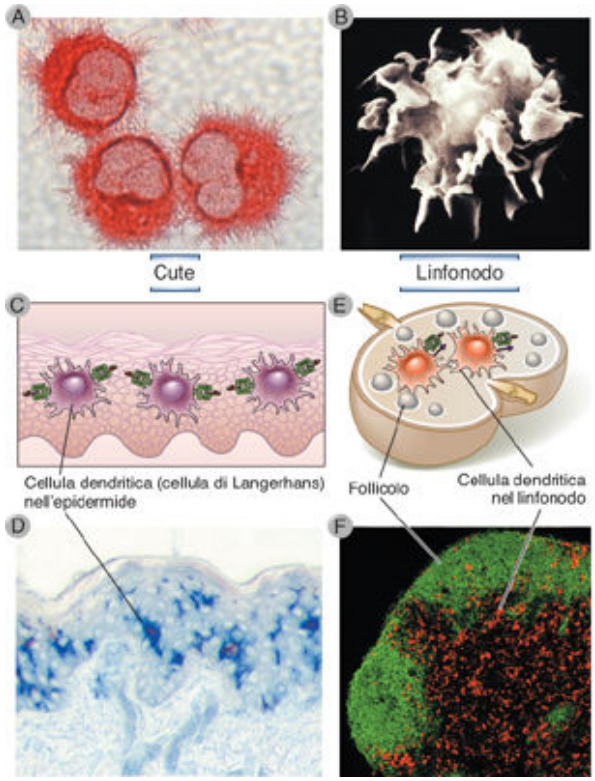


FIGURA 6-4 Cellule dendritiche. A. Foto al microscopio ottico di cellule dendritiche in coltura derivate da precursori midollari. **B.** Foto al microscopio elettronico a scansione di una cellula dendritica, che mostra le estese estroflessioni della membrana. **C**, **D.** Cellule dendritiche della cute, illustrate schematicamente (**C**) e in una sezione di cute (**D**) colorata con un anticorpo specifico per le cellule di Langerhans (che appaiono blu in questa reazione immunoenzimatica). **E**, **F.** Cellule dendritiche in un linfonodo, illustrate schematicamente (**E**) e in una sezione linfonodale di topo (**F**) colorata con anticorpi fluorescenti verso le cellule B follicolari (*in verde*) e le cellule dendritiche della zona T (*in rosso*). (***A***, ***B*** *e* ***D,*** *Per gentile concessione del Dr. Y-J. Liu, MD, Anderson Cancer Center, Houston, TX.* ***F,*** *Per gentile concessione delle Dr.sse Kathryn Pape e Jennifer Walter, University of Minnesota School of Medicine, Minneapolis.*)

- Le **DC classiche** (anche denominate DC convenzionali), che furono inizialmente identificate in base alla morfologia e alla loro capacità di stimolare efficacemente le risposte dei linfociti T, rappresentano il tipo di cellule dendritiche più numeroso negli organi linfoidi. La maggior parte di esse deriva da precursori mielodi, che migrano dal midollo osseo ai tessuti linfoidi e non-linfoidi per differenziarsi localmente. In modo analogo ai macrofagi tissutali, queste cellule campionano costantemente l'ambiente circostante. Nell'intestino, per esempio, le cellule dendritiche protrudono attraverso le cellule epiteliali e si proiettano nel lume, dove

possono catturare gli antigeni presenti. Le cellule di Langerhans sono le cellule dendritiche che popolano l'epidermide e assolvono allo stesso compito nei confronti degli antigeni cutanei.

In assenza di situazioni infettive o infiammatorie, le cellule dendritiche classiche catturano gli antigeni tissutali e li trasportano ai linfonodi drenanti senza produrre le citochine e le molecole di membrana necessarie per attivare una risposta immunitaria. In questo modo, le cellule dendritiche presentano antigeni self a linfociti T autoreattivi causando la loro inattivazione o morte, oppure promuovono la formazione di linfociti T regolatori. Questi meccanismi sono importanti per mantenere la tolleranza al self e per prevenire le risposte autoimmuni (vedi Cap. 15). In seguito all'incontro con microbi e citochine, le cellule dendritiche si attivano: aumentano l'espressione di molecole costimolatorie, producono citochine infiammatorie e migrano dai tessuti periferici ai linfonodi drenanti per dare inizio alla risposta dei linfociti T (vedi più avanti).

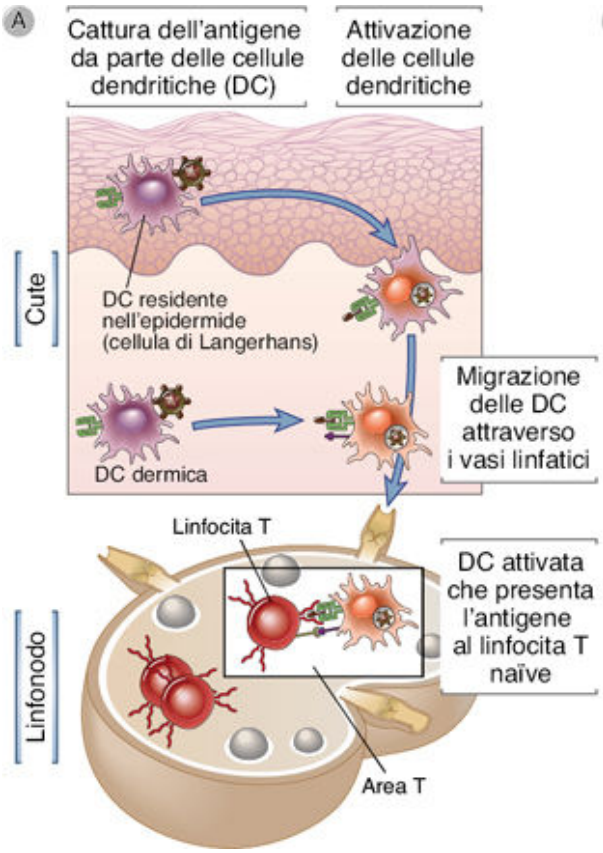
Le cellule dendritiche classiche possono essere suddivise in due principali tipi. Il primo, che nell'uomo può essere identificato sulla base della elevata espressione di BDCA-1/CD1c, o dell'integrina CD11b nel topo, è particolarmente efficiente nel promuovere le risposte dei linfociti T $CD4^+$. Il secondo, che può essere identificato dall'espressione di BDCA-3 nell'uomo e nel topo, dall'espressione di CD8 (nei tessuti linfoidi) o dell'integrina CD103 (nei tessuti periferici), è particolarmente efficiente nel processo della cross-presentazione (descritto più avanti in questo capitolo). In alcune condizioni infiammatorie, le cellule dendritiche possono originare anche dai monociti.

- Le **DC plasmacitoidi** assomigliano morfologicamente alle plasmacellule e acquisiscono la morfologia e le funzioni tipiche delle DC solo dopo l'attivazione. Si sviluppano nel midollo da un precursore comune alle cellule dendritiche classiche. Sono presenti nel sangue e in numero limitato negli organi linfoidi. Al contrario delle cellule dendritiche classiche, le cellule dendritiche plasmacitoidi sono scarsamente fagocitiche e non campionano gli antigeni ambientali. La loro funzione principale è la secrezione di grandi quantità di IFN di tipo I in risposta a infezioni virali (vedi Cap. 4). Durante le infezioni virali, le cellule dendritiche plasmacitoidi si differenziano in cellule che possiedono le

caratteristiche delle cellule dendritiche classiche e sono in grado di presentare gli antigeni virali ai linfociti T specifici.

Cattura e trasporto dell'antigene da parte delle cellule dendritiche

Le DC residenti nell'epitelio e nei tessuti catturano e trasportano gli antigeni proteici ai linfonodi drenanti (Fig. 6-5). Le cellule dendritiche tissutali quiescenti (talvolta denominate cellule dendritiche immature) esprimono recettori di membrana, come le lectine di tipo C, attraverso cui catturano ed endocitano i microbi, o i prodotti microbici e successivamente trasformano le proteine ingerite in peptidi in grado di legarsi alle molecole MHC. Oltre che attraverso l'endocitosi e la fagocitosi mediate da recettori specifici, le DC possono acquisire gli antigeni per micropinocitosi e macropinocitosi, processi per cui non è necessario il riconoscimento attraverso recettori specifici, ma in cui le DC catturano qualunque particella sia presente nelle loro vicinanze in fase fluida.



B

	Cellula dendritica tissutale	Cellula dendritica attivata
Funzione principale	Cattura dell'antigene	Presentazione dell'antigene ai linfociti T
Espressione dei recettori per l'Fc e dei recettori per il mannosio	++	–
Espressione delle molecole coinvolte nell'attivazione dei linfociti T: B7, ICAM-1, IL-12	– o bassa	++
Molecole MHC di classe II		
Emivita	~10 ore	>100 ore
Numero di molecole di superficie	~10^6	~7 x 10^6

FIGURA 6-5 Ruolo delle cellule dendritiche nella cattura e nella presentazione dell'antigene. A. Le cellule dendritiche (DC) immature della cute (cellule di Langerhans) o del derma (DC dermiche) catturano gli antigeni che penetrano attraverso l'epidermide e li trasportano ai linfonodi regionali. Durante questa migrazione, le DC maturano e diventano APC efficienti. **B.** La tabella riassume alcune importanti modificazioni delle funzioni delle DC che avvengono durante la loro maturazione.

Contemporaneamente alla cattura degli antigeni, i prodotti microbici sono riconosciuti da recettori Toll-like e da altri recettori dell'immunità innata espressi dalle cellule dendritiche e da altre cellule, dando origine anche a risposte immunitarie innate (vedi Cap. 4). Le DC vengono attivate da questi segnali e dalle citochine, come il fattore di necrosi tumorale (*Tumor Necrosis Factor*, TNF), prodotte in risposta ai microbi. Le DC attivate (chiamate anche DC *mature*) perdono la loro adesività per gli epiteli e i tessuti e migrano verso i linfonodi. Le DC iniziano anche a esprimere un recettore per le chemochine, chiamato CCR7, specifico per due chemochine, CCL19 e CCL21, prodotte dai vasi linfatici e nelle aree T dei linfonodi. Queste chemochine indirizzano le DC cariche di antigeni microbici inizialmente nei vasi linfatici e infine nelle aree T dei linfonodi. Anche i linfociti T naïve esprimono il CCR7; questo è il motivo per cui i linfociti T naïve migrano nelle stesse aree linfonodali dove si concentrano anche le DC cariche di antigeni (vedi Cap. 3). La colocalizzazione delle DC attivate che trasportano gli antigeni e dei linfociti T naïve aumenta la probabilità che i linfociti T incontrino l'antigene per cui sono specifici.

Inoltre, l'attivazione trasforma le DC da cellule specializzate nella cattura dell'antigene a cellule in grado di attivare i linfociti T a cui presentano l'antigene. Le DC attivate esprimono elevati livelli di molecole MHC a cui sono legati gli antigeni peptidici ed elevati livelli di molecole costimolatorie necessarie per l'attivazione dei linfociti T. Questo determina che le DC arrivate nei linfonodi si trasformino in potenti APC in grado di attivare i linfociti T. I linfociti T naïve che ricircolano nei linfonodi incontrano queste APC e le cellule dotate di specificità per i complessi peptide-MHC si attivano. Questo evento costituisce lo stadio iniziale dell'attivazione delle risposte T agli antigeni proteici. Gli antigeni possono essere trasportati ai linfonodi anche in forma solubile. In questo caso, le DC residenti nei linfonodi e nella milza catturano gli antigeni presenti rispettivamente nella linfa e nel sangue subendo l'effetto maturativo che deriva dai prodotti microbici. Quando la linfa entra nel linfonodo attraverso i vasi linfatici afferenti, essa si riversa nel seno sottocapsulare e in parte entra nei condotti generati dai fibroblasti reticolari che hanno origine nel seno e attraversano la regione corticale (vedi Cap. 2); è

qui che gli antigeni a basso peso molecolare possono essere catturati dalle DC che si insinuano tra i fibroblasti reticolari tramite processi citoplasmatici. Altri antigeni presenti nel seno sottocapsulare sono catturati dai macrofagi e dalle DC, che portano gli antigeni nella regione corticale. Anche i linfociti B dei linfonodi possono riconoscere e internalizzare antigeni solubili. Le DC, i macrofagi e i linfociti B sono in grado di processare gli antigeni catturati e di presentarli ai linfociti T naïve e ai linfociti T effettori generatisi in seguito a una precedente stimolazione.

La raccolta e la concentrazione degli antigeni nei linfonodi sono affiancate da altre alterazioni anatomiche che concorrono a queste funzioni. Le superfici mucose dei sistemi gastrointestinale e respiratorio, oltre a essere drenate da una rete di capillari linfatici, contengono strutture linfoidi secondarie specializzate che possono direttamente campionare il contenuto del lume di questi organi, alla ricerca di materiale antigenico. Gli organi linfoidi mucosali meglio caratterizzati sono le placche di Peyer dell'ileo e la tonsilla faringea (vedi Cap. 14). Il circolo ematico è controllato dalle APC della milza che controllano gli antigene presenti in circolo. Tali antigeni possono raggiungere il sangue direttamente dai tessuti o per via linfatica attraverso il dotto toracico.

Funzione di presentazione dell'antigene delle cellule dendritiche

Gli studi condotti *in vitro* e *in vivo* hanno definito il ruolo insostituibile delle DC, che attraverso la cattura e la presentazione dell'antigene ai linfociti T determinano l'insorgere delle risposte primarie dei linfociti T in risposta agli antigeni proteici. Questa sequenza di eventi è stata inizialmente identificata per l'attivazione dei linfociti T $CD4^+$ e successivamente anche per le risposte dei linfociti T $CD8^+$.

Le DC possiedono diverse caratteristiche che le rendono le più efficaci APC per l'attivazione delle risposte primarie dei linfociti T.

- Le DC sono localizzate strategicamente nei siti di ingresso degli antigeni e dei microrganismi (negli epiteli), oltre che nei tessuti che possono essere colonizzati dai microbi.
- Le DC esprimono recettori che permettono loro di captare e di rispondere ai microbi.
- Le DC migrano dagli epiteli e dai tessuti periferici attraverso i vasi linfatici preferenzialmente nelle aree T dei linfonodi, regioni in cui

migrano anche i linfociti T naïve che entrano nei linfonodi attraverso il circolo ematico.
- Le DC mature esprimono sulla loro membrana un numero elevato di complessi peptide-MHC, molecole costimolatorie e citochine, tutte molecole necessarie per l'attivazione dei linfociti T naïve.

Le DC possono inglobare cellule infettate e presentarne gli antigeni ai linfociti T CD8$^+$. Le DC sono le migliori APC per indurre le risposte primarie dei linfociti T CD8$^+$, ma questo fa sorgere un problema perché gli antigeni proteici che questi linfociti riconoscono devono originare da proteine citoplasmatiche delle cellule dendritiche. Le proteine virali vengono prodotte in qualsiasi tipo di cellula che sia stata infettata da un virus, non necessariamente solo in cellule dendritiche. Alcune DC specializzate hanno la capacità di ingerire cellule infettate o frammenti cellulari e di trasportare le proteine virali nel citoplasma, consentendone la presentazione ai linfociti T CD8$^+$. Questo processo è chiamato *presentazione crociata o stimolazione crociata* (*cross-presentation* o *cross-priming*) e verrà trattato più avanti in questo capitolo.

Funzioni di altre cellule che presentano l'antigene

Le DC hanno un ruolo critico nell'induzione delle risposte primarie dei linfociti T, ma in alcune situazioni anche altri tipi cellulari possono svolgere un'importante funzione di APC (vedi Fig. 6-2 e Tab. 6-2).

- ***Nelle risposte cellulari, i macrofagi presentano gli antigeni dei microbi fagocitati ai linfociti T effettori, che rispondono potenziando l'attitivà microbicida dei macrofagi stessi.*** Questo processo costituisce il meccanismo centrale dell'immunità cellulare e dell'ipersensibilità di tipo ritardato (vedi Cap. 10). I monociti circolanti migrano nei siti di infezione e infiammazione, dove si differenziano in macrofagi in grado di fagocitare e uccidere i microbi. I linfociti T CD4$^+$ riconoscono gli antigeni microbici presentati dai macrofagi e forniscono segnali che aumentano la capacità microbicida dei macrofagi stessi.
- ***Nelle risposte umorali, i linfociti B internalizzano gli antigeni proteici e presentano i rispettivi peptidi ai linfociti T helper.*** Questa funzione di

APC dei linfociti B è essenziale per la produzione di anticorpi in risposta ad antigeni T-dipendenti (vedi Cap. 12).

- ***Tutte le cellule nucleate possono presentare peptidi, derivati da antigeni proteici citosolici, ai CTL CD8+.*** Tutte le cellule nucleate sono suscettibili all'infezione virale e a mutazioni che possono causare la trasformazione neoplastica. Quindi, è importante che il sistema immunitario sia in grado di riconoscere in ogni cellula gli antigeni citosolici nonself, come gli antigeni virali e le proteine mutate. I CTL $CD8^+$ sono capaci di riconoscere questi antigeni e di eliminare le cellule in cui gli antigeni vengono prodotti. I CTL CD8+ possono inoltre riconoscere i microbi fagocitati nel caso in cui questi, o i loro antigeni, siano riusciti a fuoriuscire dalle vescicole fagocitiche passando nel citosol.
- ***Altri tipi cellulari che esprimono molecole MHC di classe II e possono presentare gli antigeni ai linfociti T includono le cellule endoteliali e alcune cellule epiteliali.*** Le cellule dell'endotelio vascolare possono presentare gli antigeni ai linfociti T che aderiscono alle pareti del vaso; questo processo può contribuire al reclutamento e all'attivazione dei linfociti T effettori nel corso delle risposte immunitarie cellulari. Anche le cellule endoteliali nei trapianti sono bersaglio dei linfociti T che reagiscono contro gli antigeni trapiantati (vedi Cap. 17). Varie cellule epiteliali e mesenchimali possono esprimere molecole MHC di classe II in risposta all'IFN-γ. Il significato fisiologico della presentazione dell'antigene da parte di queste popolazioni cellulari non è chiaro. Poiché generalmente esse non esprimono molecole costimolatorie e non sono efficienti nel processare le proteine in peptidi che legano l'MHC, è verosimile che esse non svolgano un ruolo di primo piano nella risposta T. Anche le cellule epiteliali timiche esprimono costitutivamente molecole MHC di classe II e hanno un ruolo specifico nella presentazione dei complessi MHC-peptide nell'ambito del processo di selezione che definisce il repertorio di specificità dei linfociti T (vedi Cap. 8).

COMPLESSO MAGGIORE DI ISTOCOMPATIBILITÀ

La scoperta del ruolo fondamentale dell'MHC nel riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$ ha rivoluzionato il campo dell'immunologia e ha aperto la strada alle nostre attuali conoscenze sull'attivazione e le funzioni dei linfociti.

Scoperta dell'MHC

MHC del topo (complesso H-2)

L'MHC è stato scoperto nell'ambito di studi sul trapianto di tessuti, molti anni prima che la struttura e la funzione fossero identificate. Sin dagli albori della storia dei trapianti era noto che i tessuti, come la cute, trapiantati tra individui non identici, venivano rigettati, mentre lo stesso tipo di trapianto tra gemelli identici attecchiva. Questi risultati dimostravano il ruolo dei geni ereditati nel processo di rigetto del trapianto. Negli anni Quaranta del Novecento, per analizzare le basi genetiche del rigetto del trapianto, i ricercatori produssero ceppi di topi inbred, facendo accoppiamenti ripetuti tra fratelli. I topi inbred sono omozigoti in ogni locus genico (cioè hanno due copie dello stesso allele di ogni gene, una da ogni genitore) e ogni topo inbred è geneticamente identico (*singenico*) a ogni altro topo dello stesso ceppo (cioè esprimono tutti gli stessi alleli). Diversi ceppi possono esprimere alleli differenti e sono definiti *allogenici* l'uno rispetto all'altro. Generando ceppi congenici di topi che rigettavano trapianti da altri ceppi, ma che erano identici per tutti gli altri geni, i ricercatori hanno dimostrato che una singola regione genica è responsabile del rigetto rapido dei trapianti di tessuto; questa regione è stata chiamata *locus maggiore di istocompatibilità*. Il locus particolare che fu identificato nel topo era legato a un gene, sul cromosoma 17, che codificava per un antigene polimorfo del gruppo sanguigno chiamato *antigene II*, e quindi questa regione venne chiamata di *istocompatibilità-2* oppure, semplicemente, H-2 (dall'inglese *histocompatibility-2*). Inizialmente, si pensava che tale locus contenesse un singolo gene che controllava la compatibilità tra i tessuti. Si verificarono tuttavia eventi occasionali di ricombinazione all'interno del locus H-2 durante l'incrocio di ceppi inbred, indicando che effettivamente questa regione conteneva molti geni diversi, ma strettamente legati, molti dei quali sono coinvolti nel rigetto del trapianto. La regione genetica che controllava il rigetto del trapianto e conteneva vari geni correlati venne chiamata **complesso maggiore di istocompatibilità**. Anche se non era ancora noto al tempo dei

primi esperimenti, il rigetto del trapianto dipende in gran parte da processi mediati dai linfociti T (vedi Cap. 17), quindi non è sorprendente che ci sia una relazione tra i geni MHC e il rigetto del trapianto, Infatti, le molecole MHC legano i peptidi che i linfociti T riconoscono.

MHC dell'uomo (HLA)

L'MHC umano fu scoperto nell'ambito della ricerca di molecole di superficie espresse da cellule che fossero riconosciute come estranee da un altro individuo. Questo fu possibile quando si scoprì che individui che avevano ricevuto molte trasfusioni di sangue e in modo simile pazienti che avevano avuto un trapianto di rene possedevano anticorpi che riconoscevano le cellule dei donatori degli organi trapiantati. In modo analogo, donne multipare avevano anticorpi circolanti che riconoscevano le cellule paterne. Le proteine riconosciute da questi anticorpi furono chiamate **antigeni leucocitari umani** (*Human Leukocyte Antigens*, HLA): leucocitari perché gli anticorpi venivano testati per la loro capacità di legarsi a leucociti di altri individui; antigeni perché le molecole venivano riconosciute dagli anticorpi. Studi successivi hanno mostrato che, come nei topi, la presenza di un particolare allele HLA è uno dei maggiori determinanti dell'attecchimento o del rigetto del trapianto (vedi Cap. 17). Studi biochimici hanno fornito informazioni sul fatto che la struttura delle proteine H-2 di topo e dell'HLA dell'uomo è fondamentalmente simile. Da questi risultati si è concluso che i geni che determinano il destino dei tessuti trapiantati sono presenti in tutte le specie di mammiferi e sono omologhi ai geni H-2 identificati inizialmente nel topo; questi sono definiti *geni MHC*. Altri geni polimorfi che contribuiscono in misura minore al rigetto del trapianto sono chiamati *geni minori di istocompatibilità*; torneremo su questo punto nel Capitolo 17, quando discuteremo dell'immunologia dei trapianti.

Geni della risposta immunitaria

Per quasi vent'anni dopo la sua scoperta, all'MHC fu attribuito il solo ruolo di regolatore del rigetto del trapianto. Questo era particolarmente strano per gli immunologi, perché il trapianto non è un processo fisiologico e non vi era alcuna ragione ovvia per cui un set di geni dovesse essersi preservato durante l'evoluzione, se l'unica sua funzione fosse stata quella di controllare il rigetto

di tessuti trapiantati. Negli anni Sessanta e Settanta si scoprì che i geni MHC erano di fondamentale importanza per tutte le risposte immunitarie agli antigeni proteici. Gli immunologi scoprirono che ceppi inbred di una singola specie (cavie o topi) differivano nella loro capacità di produrre anticorpi contro alcuni semplici polipeptidi di sintesi e che la loro responsività era ereditata come un carattere dominante mendeliano. I geni rilevanti vennero chiamati *geni della risposta immunitaria* (*Immune response*, Ir) e furono mappati nell'MHC. Oggi sappiamo che i geni *Ir* sono, infatti, geni che codificano per le molecole MHC, che differiscono nella loro abilità di legare e presentare i peptidi derivati dagli antigeni proteici. I ceppi responder, cioè quelli in grado di montare una risposta contro un dato antigene polipeptidico, ereditano alleli MHC i cui prodotti si possono legare a peptidi derivati da questi antigeni, formando complessi peptide-MHC. I complessi possono essere riconosciuti dai linfociti T helper, che cooperano con i linfociti B nella produzione dei relativi anticorpi. I ceppi non responder esprimono invece molecole MHC incapaci di legare peptidi derivati da un dato antigene proteico, pertanto questi ceppi non possono attivare linfociti T helper e di conseguenza produrre anticorpi specifici per l'antigene. È stato successivamente osservato che molte malattie autoimmuni sono associate alla presenza di particolari alleli MHC e tali geni risultano quindi avere un ruolo chiave nel controllo delle risposte immunitarie. Questi studi hanno dato impulso a ulteriori e dettagliate analisi dei geni e delle proteine MHC.

Fenomeno della restrizione per MHC

La dimostrazione formale che l'MHC è coinvolto nel riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti T venne dalle ricerche compiute da Rolf Zinkernagel e Peter Doherty sulla dimostrazione sperimentale della restrizione per MHC. Nel loro studio originale riportato nel 1974, questi ricercatori esaminarono il riconoscimento di cellule infettate da virus da parte dei CTL virus-specifici, in ceppi di topi inbred. Se un topo viene infettato da un virus, genera CTL $CD8^+$ specifici per i determinanti virali. Questi CTL riconoscono e uccidono cellule infettate da quel virus solo se esse esprimono alleli MHC identici a quelli espressi dall'animale in cui i CTL sono stati generati (Fig. 6-6). Usando ceppi di topi congenici, che sono stati precedentemente definiti per MHC (cioè identici in tutti i loci genetici, escluso l'MHC), è stato possibile dimostrare che i CTL e le cellule bersaglio infettate dovevano derivare da topi

che avessero in comune almeno un allele MHC di classe I. Esperimenti successivi dimostrarono che le risposte dei linfociti T helper $CD4^+$ sono ristrette per gli alleli MHC self di classe II.

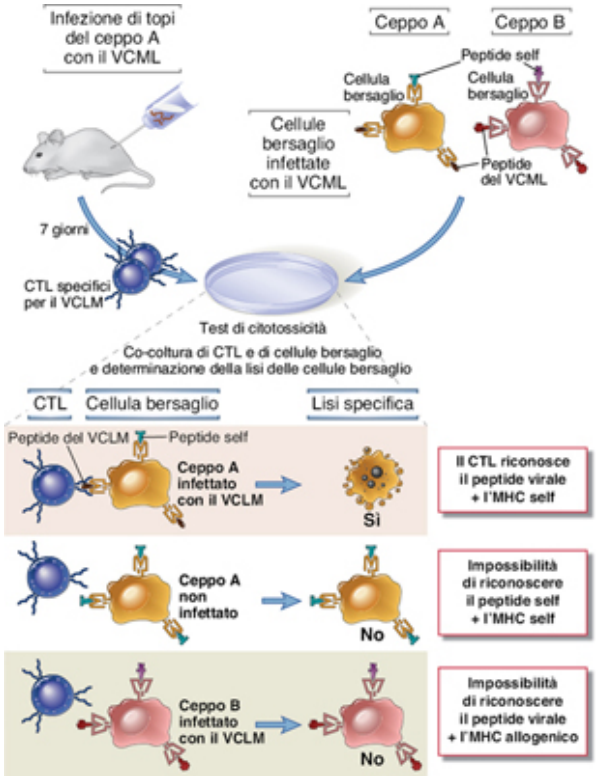


FIGURA 6-6 Dimostrazione sperimentale del fenomeno della restrizione per MHC dei linfociti T citotossici. I linfociti T citotossici specifici per un virus (CTL) generati nei topi di ceppo A infettati dal virus uccidono solo cellule bersaglio singeniche (ceppo A) infettate con quel virus. I CTL non uccidono bersagli di ceppo A non infetti (che esprimono peptidi self ma non peptidi virali) o bersagli di ceppo B infettati (che esprimono alleli MHC differenti dal ceppo A). Usando ceppi di topi congenici che differiscono solo per i loci MHC I, è stato dimostrato che il riconoscimento dell'antigene da parte dei CTL $CD8^+$ è ristretto per MHC di classe I. VCML, virus della coriomeningite linfocitaria.

Continueremo la nostra discussione descrivendo le proprietà dei geni e delle proteine MHC e concluderemo descrivendo la capacità di queste proteine di legare e presentare gli antigeni.

Geni MHC

Il locus MHC contiene due tipi di geni polimorfi, cioè i geni di classe I e II, che codificano per due gruppi di proteine strutturalmente distinte ma omologhe tra loro, oltre ad altri geni non polimorfi i cui prodotti sono coinvolti nella presentazione dell'antigene (Fig. 6-7). Le molecole MHC di

classe I presentano i peptidi ai linfociti T $CD8^+$ dai quali vengono riconosciute, mentre le molecole MHC di classe II presentano i peptidi ai linfociti T $CD4^+$; ognuno di questi tipi cellulari svolge funzioni differenti nella protezione contro i microbi.

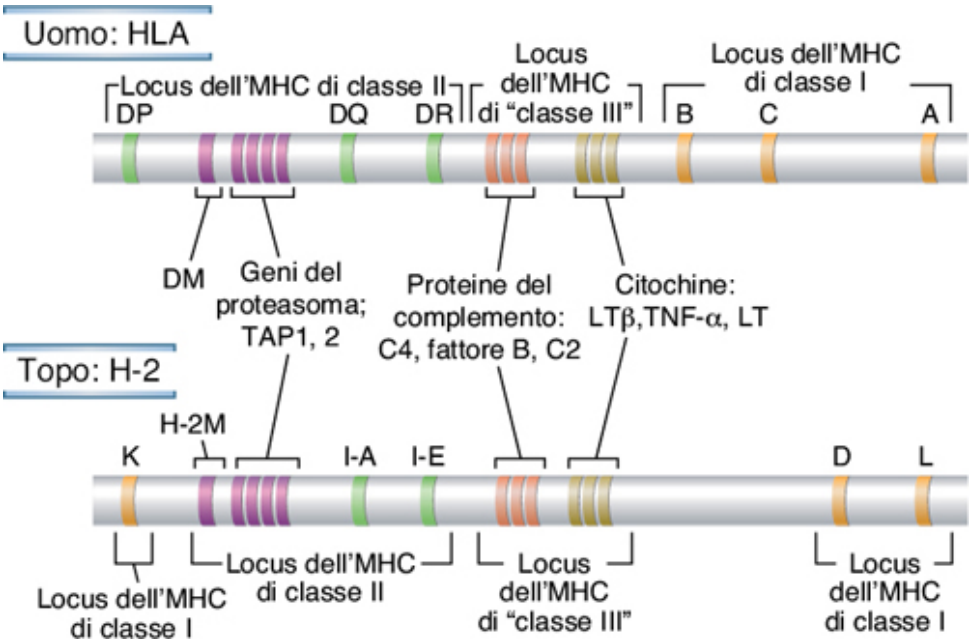


FIGURA 6-7 Mappa schematica dei loci dell'MHC umano e di quello murino. L'organizzazione generale dei geni nel locus MHC nell'uomo e nel topo è simile. Le ampiezze dei geni e i segmenti di DNA mostrati non sono in scala. I loci di classe II sono riportati come un unico blocco, ma in realtà ogni locus comprende più geni. Il locus dell'MHC di "classe III" riguarda i geni che codificano molecole diverse dalle molecole che espongono il peptide; questo termine non è più usato.

I geni MHC di classe I e II sono i geni più polimorfi presenti nel genoma di qualsiasi mammifero. Gli studi sull'MHC del topo furono eseguiti con un numero limitato di incroci e con ceppi congenici e, sebbene si fosse riconosciuto che i geni MHC del topo erano polimorfi, vennero identificati solo circa 20 alleli di ciascun gene MHC nei ceppi allora disponibili. Gli studi sierologici nell'uomo vennero condotti in una popolazione outbred. Una straordinaria caratteristica che emerge da questi studi è l'inaspettata diversificazione presente tra gli individui, chiamata polimorfismo. Nella popolazione, il numero totale di alleli HLA con sequenze aminoacidiche differenti è stimata in un numero superiore a 5.000, con più di 2.500 alleli per il solo locus HLA-B. Le differenze nelle molecole MHC (responsabili del polimorfismo) derivano dalle distinte sequenze di DNA ereditate e non dalla ricombinazione genica (come avviene nei recettori per l'antigene; vedi Cap.

8). Come vedremo più avanti in questo capitolo, i residui polimorfi di molecole MHC determinano la specificità di legame dei peptidi e del riconoscimento da parte dei linfociti T; questo ha portato a chiedersi perché i geni MHC siano polimorfi. Il polimorfismo MHC potrebbe essersi evoluto poiché esso garantisce che gli individui siano in grado di affrontare la diversità dei microbi e la popolazione sia sempre protetta anche di fronte alla devastante perdita di vite dovuta a nuove infezioni. Tuttavia, non è ancora del tutto compresa la natura della pressione selettiva che ha preservato un così vasto numero di alleli nella popolazione.

I geni MHC sono espressi in modo codominante in ogni individuo. In altre parole, per un dato gene MHC, ogni individuo esprime alleli che sono ereditati da ognuno dei due genitori. Questo massimizza il numero di molecole MHC disponibili per legare i peptidi da presentare ai linfociti T.

Loci MHC dell'uomo e del topo

Nell'uomo, l'MHC è localizzato sul braccio corto del cromosoma 6 e occupa un importante segmento di DNA, estendendosi per circa 3.500 kb. (Per confronto, un gene umano di grandi dimensioni può estendersi per 50-100 kb e la dimensione dell'intero genoma di *Escherichia coli* è di circa 4.500 kb.) In termini genetici classici, l'MHC si estende per circa 4 cM, ciò significa che eventi di crossing-over nell'MHC si verificano con una frequenza di circa il 4% delle meiosi. Nella Figura 6-8 è rappresentata una mappa molecolare dell'MHC umano.

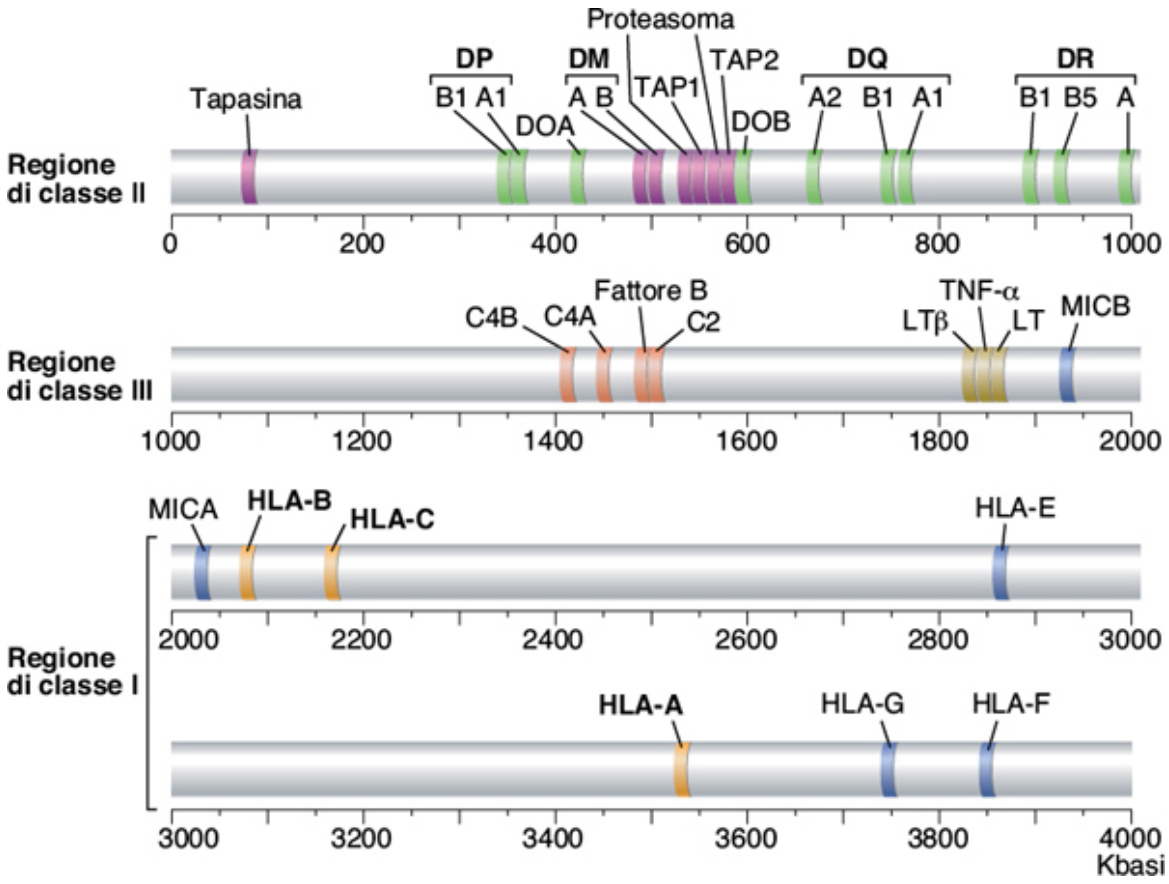


FIGURA 6-8 Mappa dell'MHC umano. La figura mostra i geni localizzati all'interno del locus MHC umano. Oltre ai geni MHC di classe I e II, anche i geni *HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G* e *MIC* codificano per molecole simili a quelle tipo classe I; molti dei prodotti di questi geni sono riconosciuti dalle cellule NK. I geni *C4*, *C2* e *fattore B* codificano per proteine del complemento; *tapasina*, *DM*, *DO*, *TAP* e *proteasomi* codificano per proteine coinvolte nella processazione dell'antigene; LTα, LTβ e TNF codificano per le citochine. Nel complesso HLA sono localizzati anche molti pseudogeni e geni di cui non è noto un ruolo nelle risposte immuni; questi geni e pseudogeni non sono mostrati nello schema per semplicità.

I geni HLA umani di classe I sono stati inizialmente definiti con approcci sierologici (legame di anticorpi). Vi sono tre geni MHC di classe I chiamati *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*, che codificano per tre molecole MHC di classe I, chiamate in modo analogo. I geni MHC di classe II furono inizialmente identificati mediante test in cui i linfociti T di un individuo venivano stimolati con cellule di un altro individuo (questa reazione viene chiamata *reazione linfocitaria mista*; vedi Cap. 17). Vi sono tre loci dei geni HLA di classe II chiamati *HLA-DP*, *HLA-DQ* e *HLA-DR*. Ogni molecola MHC di classe II è composta di eterodimeri di polipeptidi α e β, e i loci DP, DQ e DR contengono ognuno geni distinti chiamati *A* o *B*, che codificano rispettivamente per la catena α o β, su ogni copia del cromosoma 6. Ogni individuo possiede due

geni *HLA-DP* (chiamati *DPA1* e *DPB1*, che codificano per le catene α e β), due geni *HLA-DQ*α (*DQA1*, 2), un gene *HLA-DQ*β (*DQB1*), un gene *HLA-DR*α (*DRA1*) e uno o due geni *HLA-DR*β (*DRB1* e *DRB3, 4* o *5*). La nomenclatura del locus HLA tiene conto del grande polimorfismo identificato con metodi sierologici e molecolari. Così, sulla base della moderna tipizzazione molecolare, gli alleli individuali si possono chiamare HLA-A*0201, che descrive per esempio il sottotipo 01 dell'*HLA-A2*, o HLA-DRB1*0401, che si riferisce al sottotipo 01 del *DR4B1* e via di seguito.

L'MHC del topo, localizzato sul cromosoma 17, occupa circa 2.000 kb di DNA e i geni sono organizzati in un ordine leggermente differente da quello dell'MHC umano. Uno dei geni di classe I (*H-2K*) è centromerico alla regione della classe II, ma gli altri geni di classe I sono telomerici alla regione della classe II. Nel topo ci sono tre geni MHC di classe I chiamati *H-2K*, *H-2D* e *H-2L*, che codificano tre differenti proteine MHC di classe I, K, D e L. Questi geni sono omologhi ai geni umani *HLA-A*, *B* e *C*. Gli alleli MHC di ceppi inbred sono indicati con le lettere minuscole (per esempio *a*, *b*) e sono riferiti a tutti i geni MHC del ceppo di topo in cui sono stati identificati in origine. Nel gergo della genetica del topo, l'allele del gene *H-2K* di un ceppo con MHC di tipo k è chiamato K^k (si legge K di k), mentre l'allele del gene *H-2K* di un ceppo con MHC di tipo d è chiamato K^d (K di d). Una terminologia simile è usata per gli alleli di *H-2D* e *H-2L*. I topi hanno due loci MHC di classe II, chiamati *I-A* e *I-E*, che codificano per le molecole I-A e I-E, rispettivamente. Questi loci si trovano nelle sottoregioni A ed E della regione *Ir* dell'MHC e si è scoperto che sono i geni *Ir*, di cui si è parlato già in precedenza. I geni di classe II del topo sono omologhi ai geni umani *HLA-DP*, *DQ* e *DR*. L'allele *I-A* del ceppo di topi inbred con gli alleli K^k e D^k viene chiamato $I\text{-}A^k$ (si legge I A di k). Per l'allele *I-E* si usa una terminologia simile. Come nell'uomo, ci sono 2 geni differenti nei loci *I-A* e *I-E*, chiamati *A* e *B*, che codificano per le catene α e β di ogni molecola MHC di classe II.

La serie degli alleli MHC presenti in ciascun cromosoma è detta **aplotipo** MHC. Per esempio, un aplotipo HLA di un individuo potrebbe essere HLA-A2, -B5, -DR3 e così via. Tutti i soggetti eterozigoti, naturalmente, hanno due aplotipi HLA. Il topo inbred, essendo omozigote, ha un singolo aplotipo. Così, l'aplotipo di un topo $H\text{-}2^d$ è $H\text{-}2K^d$ $I\text{-}A^d$ $I\text{-}E^d$ D^d L^d.

Espressione delle molecole MHC

Le molecole MHC sono necessarie per presentare l'antigene ai linfociti T e per questo motivo l'espressione dei geni MHC in una cellula determina se gli antigeni non-self (per esempio quelli microbici) in questa cellula saranno riconosciuti dai linfociti T. Esistono molte caratteristiche importanti relative all'espressione delle molecole MHC, che contribuiscono al ruolo di protettivo delle molecole MHC nei confronti delle infezioni microbiche.

Le molecole di classe I sono espresse su quasi tutte le cellule nucleate, mentre le molecole di classe II sono normalmente espresse solo su DC, linfociti B, macrofagi e pochi altri tipi di cellule. Tale andamento è intimamente legato alle funzioni dei linfociti T ristretti per classe I e classe II. Come discusso in precedenza, i CTL CD8+ sono ristretti per MHC di classe I e uccidono le cellule che sono state infettate da microbi intracellulari, come i virus, così come i tumori che esprimono antigeni tumorali e qualsiasi altra cellula nucleata che ospiti un virus o che si sia trasformata in cellula tumorale. Pertanto, l'espressione delle molecole MHC di classe I sulle cellule nucleate serve precisamente a questo scopo, fornendo un sistema di esposizione degli antigeni intracellulari. Invece i linfociti T helper $CD4^+$ ristretti per classe II svolgono una serie di funzioni che prevedono il riconoscimento dell'antigene presentato da uno spettro di tipi cellulari più limitato. In particolare, i linfociti T $CD4^+$ naïve riconoscono gli antigeni che sono catturati e presentati dalle DC negli organi linfoidi. I linfociti T helper $CD4^+$ differenziati hanno principalmente la funzione di attivare (o aiutare) i macrofagi a eliminare i microbi extracellulari che sono stati fagocitati e di attivare i linfociti B a produrre anticorpi per eliminare i microrganismi extracellulari. Le molecole di classe II sono perciò espresse principalmente da questi tipi cellulari e costituiscono un sistema per presentare peptidi che derivano dai microrganismi e dalle proteine extracellulari.

L'espressione delle molecole MHC è aumentata dalle citochine prodotte durante le risposte immunitarie innate e specifiche. Sebbene le molecole MHC di classe I siano espresse in modo costitutivo da tutte le cellule nucleate, la loro espressione è aumentata dall'IFN-α, l'IFN-β e l'IFN-γ. Gli IFN sono citochine che vengono prodotte precocemente durante la risposta immunitaria innata contro molti virus (vedi Cap. 4). La risposta immunitaria innata antivirale aumenta pertanto l'espressione delle molecole MHC che presentano gli antigeni virali ai linfociti T. Questo è uno dei meccanismi tramite i quali l'immunità innata stimola la risposta immunitaria specifica.

Anche l’espressione delle molecole di classe II è regolata. L’IFN-γ è la citochina principale per stimolare l’espressione delle molecole di classe II sulle cellule che presentano l’antigene, come le DC e i macrofagi (Fig. 6-9). L’IFN-γ è prodotto dalle cellule NK durante le risposte innate e dai linfociti T attivati nelle risposte adattative. La capacità dell’IFN-γ di far aumentare l’espressione delle molecole MHC di classe II sulle cellule che presentano l’antigene rappresenta un meccanismo di amplificazione dell’immunità specifica. Come già detto, l’espressione di molecole di classe II aumenta anche in risposta a segnali che vengono dai recettori Toll-like attivati dai componenti microbici, favorendo così la presentazione degli antigeni microbici. I linfociti B esprimono costitutivamente le molecole di classe II, ne aumentano l’espressione in risposta al riconoscimento degli antigeni e alle citochine prodotte dai linfociti T helper, favorendo così la presentazione dell’antigene agli stessi linfociti T helper (vedi Cap. 12). L’IFN-γ può aumentare l’espressione di molecole MHC di classe II sulle cellule dell’endotelio vascolare e altri tipi di cellule estranee al sistema immunitario; come precedentemente detto, il ruolo di queste cellule nella presentazione dell’antigene è ancora da definire. Alcune cellule, come i neuroni, non esprimono mai molecole di classe II. In seguito all’attivazione, i linfociti T dell’uomo, ma non del topo, esprimono molecole di classe II; tuttavia, non è stata identificata alcuna citochina che sia responsabile di questa espressione e il loro significato funzionale è sconosciuto.

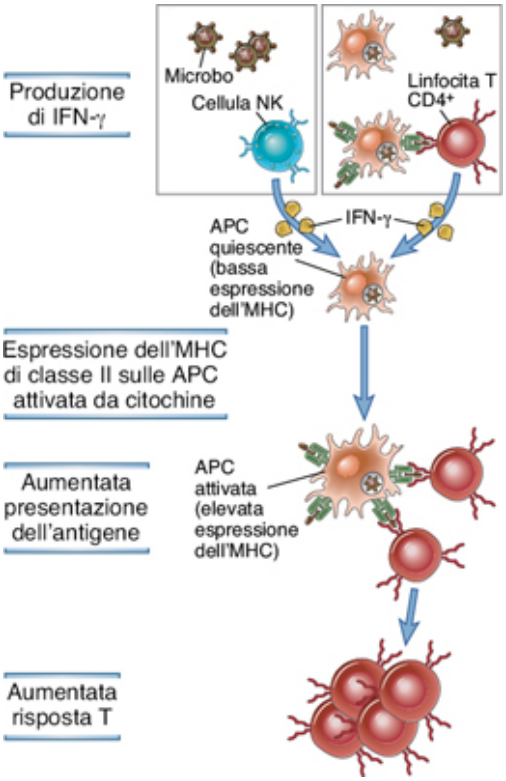


FIGURA 6-9 Incremento dell'espressione delle molecole MHC di classe II da parte dell'IFN-γ. L'IFN-γ, prodotto dalle cellule NK durante la risposta immunitaria innata contro i microrganismi o dai linfociti T durante la reazione immunitaria specifica, stimola l'espressione delle molecole MHC di classe II sulle cellule che presentano l'antigene (APC) e di conseguenza aumenta l'attivazione dei linfociti T $CD4^+$. L'IFN-γ ha un effetto simile anche sull'espressione delle molecole MHC di classe I e sull'attivazione dei linfociti T $CD8^+$.

La velocità di trascrizione genica determina l'entità della sintesi delle molecole MHC e della loro espressione sulla superficie cellulare. Le citochine potenziano l'espressione dell'MHC tramite la stimolazione della velocità di trascrizione dei geni di classe I e II. Questi effetti sono mediati dal legame dei fattori di trascrizione attivati dalle citochine alle sequenze di DNA nelle regioni promotrici dei geni MHC. Diversi fattori di trascrizione vengono assemblati e legano una proteina chiamata *induttore di trascrizione della classe II* (*Class II Transcription Activator*, CIITA); l'intero complesso si lega ai promotori dei geni della classe II e promuove un'efficiente trascrizione. Mantenendo insieme il complesso dei fattori di trascrizione, CIITA funziona come principale regolatore dell'espressione dei geni di classe II. Le mutazioni in alcuni di questi fattori di trascrizione sono la causa, nell'uomo, di immunodeficienze associate all'espressione deficitaria delle molecole MHC. Il disturbo che è stato meglio studiato tra questi è la **sindrome del linfocita**

nudo (vedi Cap. 21). I topi knockout cui manca CIITA mostrano l'assenza di espressione delle molecole di classe II nelle DC e nei linfociti B e l'incapacità dell'IFN-γ di indurre l'espressione di classe II in tutti i tipi cellulari.

L'espressione delle proteine coinvolte nella processazione e nella presentazione degli antigeni è finemente regolata. Per esempio, l'IFN-γ aumenta la trascrizione non solo dei geni di classe I e II ma anche di altri geni i cui prodotti sono necessari per l'assemblaggio di molecole MHC di classe I e la presentazione del peptide, come i geni che codificano per il trasportatore TAP e alcune subunità del proteasoma, discusso più avanti in questo capitolo.

Molecole MHC

Gli studi biochimici condotti sulle molecole MHC hanno ricevuto un grande impulso in seguito alla risoluzione della struttura cristallografica delle porzioni extracellulari delle molecole umane di classe I e II. Vari complessi molecole MHC-peptide sono stati cristallizzati e analizzati nel dettaglio. Da questi studi si è compreso in che modo le molecole MHC siano in grado di legare ed esporre i peptidi sulla superficie cellulare. In questo paragrafo riassumeremo dapprima le caratteristiche biochimiche, funzionalmente importanti, comuni alle molecole MHC di classe I e II e le caratteristiche più importanti per la loro funzione; poi passeremo a descrivere le strutture delle proteine delle molecole MHC di classe I e II, soffermandoci sulle loro significative analogie e differenze (Tab. 6-4).

TABELLA 6-4 Caratteristiche delle molecole MHC di classe I e II

Caratteristica	MHC di classe I	MHC di classe II
Catene polipeptidiche	α β_2-microglobulina	α e β
Localizzazione dei residui polimorfi	Domini α 1 e α2	Domini α 1 e β1
Sito di legame per il corecettore dei linfociti T	CD8 si lega principalmente al dominio α 3	CD4 si lega a una tasca formata da porzioni di α2 e domini β2
Dimensioni della tasca di legame del peptide	Alloggia peptidi di 8-11 aminoacidi	Alloggia peptidi di 10-30 aminoacidi o più
Nomenclatura		
Uomo	HLA-A, HLA-B, HLA-C	HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP
Topo	H-2K, H-2D, H-2L	I-A, I-E

Caratteristiche generali delle molecole MHC

Tutte le molecole MHC hanno in comune alcune caratteristiche strutturali che sono essenziali per la presentazione dei peptidi e il riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti T.

- ***Ciascuna molecola MHC contiene una tasca, o piega, extracellulare per legare i peptidi, seguita da una coppia di domini Ig ancorati alla cellula da domini transmembrana e citoplasmatici***. Come vedremo in seguito, le molecole di classe I sono composte da una catena polipeptidica codificata nell'MHC e da una seconda catena codificata al di fuori di questa regione; al contrario, le molecole di classe II sono formate da due catene polipeptidiche entrambe codificate nell'MHC. A parte questa differenza, le strutture tridimensionali delle molecole di classe I e II sono complessivamente simili.
- ***I residui aminoacidici polimorfi delle molecole MHC sono localizzati all'interno e in posizione adiacente alla tasca per il legame del peptide***. Questa tasca (anche chiamata *groove* o solco) è formata dal ripiegamento delle porzioni aminoterminali ed è composta da doppie α eliche che formano le due pareti della fessura (o *cleft*) appoggiate su un pavimento costituito da un foglietto β di 8 filamenti. I residui polimorfi, che sono gli aminoacidi che variano tra i differenti alleli MHC, sono localizzati sul pavimento e sulle pareti di questa tasca. Questa parte della molecola lega i peptidi per presentarli ai linfociti T e il recettore per l'antigene dei linfociti T interagisce con i peptidi esposti e con le α-eliche delle molecole MHC (vedi Fig. 6-1). A causa della variabilità degli aminoacidi in questa regione, molecole MHC differenti legano ed espongono peptidi differenti e sono riconosciute specificamente da recettori per l'antigene di linfociti T differenti.
- ***I domini non polimorfi di tipo Ig delle molecole MHC contengono siti di legame per i recettori CD4 e CD8 espressi dai linfociti T***. I recettori CD4 e CD8 sono espressi in distinte sottopopolazioni di linfociti T maturi e partecipano, insieme al recettore per l'antigene, al riconoscimento dell'antigene stesso; in altre parole, CD4 e CD8 si comportano da corecettori dei linfociti T (vedi Cap. 7). Il CD4 si lega selettivamente alle molecole MHC di classe II e il CD8 a quelle di classe I. Questo spiega perché ***i linfociti T helper CD4+ riconoscono soltanto le molecole MHC di classe II che presentano i peptidi, mentre i linfociti T CD8+***

riconoscono le molecole di classe I a cui sono legati i peptidi. In altre parole, si dice che le cellule T $CD4^+$ sono ristrette per MHC di classe II mentre le cellule T $CD8^+$ sono ristrette per MHC di classe I poiché i siti di legame per i CD4 e i CD8 sono rispettivamente su molecole MHC di classe II e I.

Molecole MHC di classe I

Le molecole di classe I sono formate da due catene polipeptidiche legate non covalentemente: una catena α codificata dall'MHC (o catena pesante) di 44-47 kD e una subunità non codificata dall'MHC di 12 kD chiamata β2-microglobulina (Fig. 6-10). Ciascuna catena α è orientata in modo tale per cui i tre quarti circa del polipeptide sono extracellulari, un breve segmento idrofobico attraversa il plasma e il terminale carbossilico è localizzato all'interno della cellula. I segmenti aminoterminali α1 e α2 della catena α, ciascuno lungo approssimativamente 90 residui, contribuiscono a formare una piattaforma costituita da un foglietto β di filamenti antiparalleli, che sostengono due nastri paralleli di α-elica. Questo insieme costituisce la tasca capace di legare i peptidi. La tasca possiede una larghezza sufficiente (~25 Å × 10 Å × 11 Å) a legare peptidi di 8-11 aminoacidi in una conformazione flessibile ed estesa; le estremità della tasca sono chiuse in modo tale che non vi possano alloggiare peptidi più grandi. Quindi le proteine native globulari devono essere convertite in frammenti abbastanza piccoli con una forma lineare tale da potersi legare alle molecole MHC ed essere poi riconosciuti dai linfociti T (come descritto più avanti). I residui polimorfi delle molecole di classe I sono confinati nei domini α1 e α2, dove contribuiscono alle variabilità dei diversi alleli di classe I e sono responsabili del legame dei peptidi e del riconoscimento da parte dei linfociti T (Fig. 6-11). Il segmento α3 della catena α è collocato in un dominio Ig in cui la sequenza aminoacidica viene conservata in tutte le molecole di classe I. Tale segmento contiene un'ansa che rappresenta il maggiore sito di legame per il CD8, a cui contribuiscono anche il dominio β2m e una piccola parte della porzione inferiore del dominio α2. All'estremità carbossiterminale del segmento α3 è presente una sequenza di circa 25 aminoacidi idrofobici, che attraversano il doppio strato lipidico della membrana plasmatica. Segue nel citoplasma una sequenza di circa 30 aminoacidi, che include un cluster di aminoacidi basici in grado di interagire con gruppi fosfolipidici del foglietto interno del doppio strato lipidico della

membrana cellulare e di fissare le molecole MHC alla membrana plasmatica stessa.

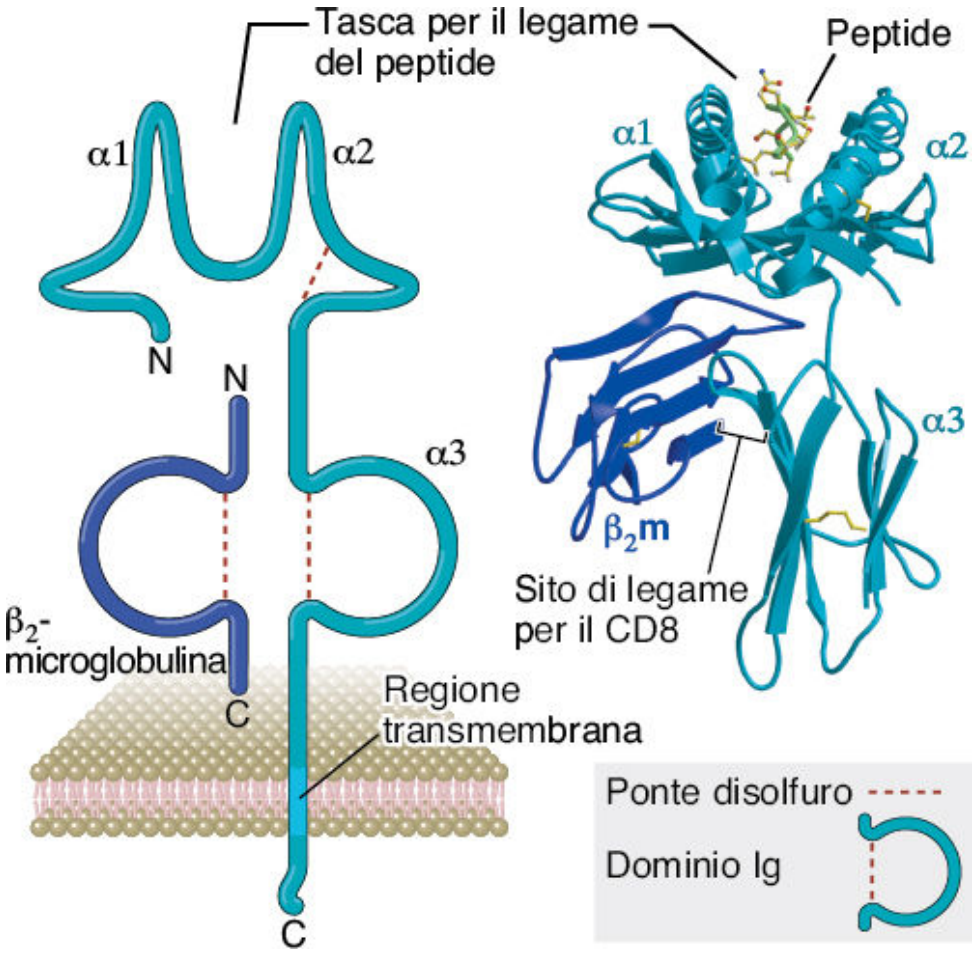


FIGURA 6-10 Struttura delle molecole MHC di classe I. Il diagramma schematico (*a sinistra*) illustra le differenti regioni della molecola MHC (non disegnata in scala). La molecola di classe I è composta da una catena α polimorfa unita in modo non covalente alla β2-microglobulina (β2m) non polimorfa. La catena α è glicosilata; i residui carboidrati non sono mostrati. Il modello strutturale (*a destra*) evidenzia la struttura della porzione extracellulare della molecola HLA-B27 con un peptide legato, svelato dalla cristallografia a raggi X. (*Per gentile concessione del Dr. P. Bjorkman, California Institute of Technology, Pasadena, California.*)

La β2-microglobulina, cioè la catena leggera delle molecole di classe I, è codificata da un gene all'esterno della regione dell'MHC, ed è chiamata così per la sua mobilità elettroforetica (β2), le sue dimensioni (micro) e la solubilità (globulina). La β2-microglobulina interagisce in modo non covalente con il dominio α3 della catena α. Allo stesso modo del segmento α3, la β2-microglobulina è strutturalmente omologa a un dominio Ig ed è simile in tutte le molecole di classe I.

La molecola MHC di classe I completamente assemblata è un trimero composto da una catena α e da una catena di β_2-microglobulina che legano un peptide; l'espressione stabile delle molecole di classe I sulla superficie cellulare richiede la presenza di tutte e tre le componenti dell'eterotrimero. Il motivo è che le interazioni della catena α con la β_2-microglobulina sono stabilizzate dal legame dell'antigene peptidico alla tasca formata da α1 e α2 e, al contrario, il legame del peptide è rinforzato dall'interazione della β_2-microglobulina con la catena α. Dato che gli antigeni peptidici sono necessari per stabilizzare le molecole MHC, soltanto le molecole MHC con il peptide già annesso vengono esposte sulla superficie cellulare.

La maggior parte degli individui è eterozigote per i geni MHC ed esprime in ciascuna cellula sei differenti molecole MHC di classe I che contengono catene α derivate dai due alleli dei geni *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* ereditati dai genitori.

Molecole MHC di classe II

Le molecole MHC di classe II sono composte da due catene polipeptidiche associate in modo non covalente, una catena α di 32-34 kD e una catena β di 29-32 kD (Fig. 6-12). Diversamente dalle molecole di classe I, i geni che codificano per entrambe le catene delle molecole di classe II sono polimorfi e si localizzano nel locus MHC.

I segmenti aminoterminali α1 e β1 delle catene di classe II contribuiscono a formare la tasca per il legame del peptide, tasca che è strutturalmente simile a quella delle molecole di classe I. Quattro stringhe del pavimento della tasca e una delle α-eliche sono formate da α1, mentre le altre quattro stringhe del pavimento e la seconda elica sono costituite dal segmento β1. I residui polimorfi sono localizzati in α1 e β1, all'interno e intorno alla tasca per il legame del peptide, come per le molecole di classe I (vedi Fig. 6-11). Nelle molecole di classe II dell'uomo, il polimorfismo maggiore si ha per le catene β. Nelle molecole di classe II, le estremità della tasca per il legame del peptide sono aperte, in modo che possano alloggiare peptidi di 30 residui o più.

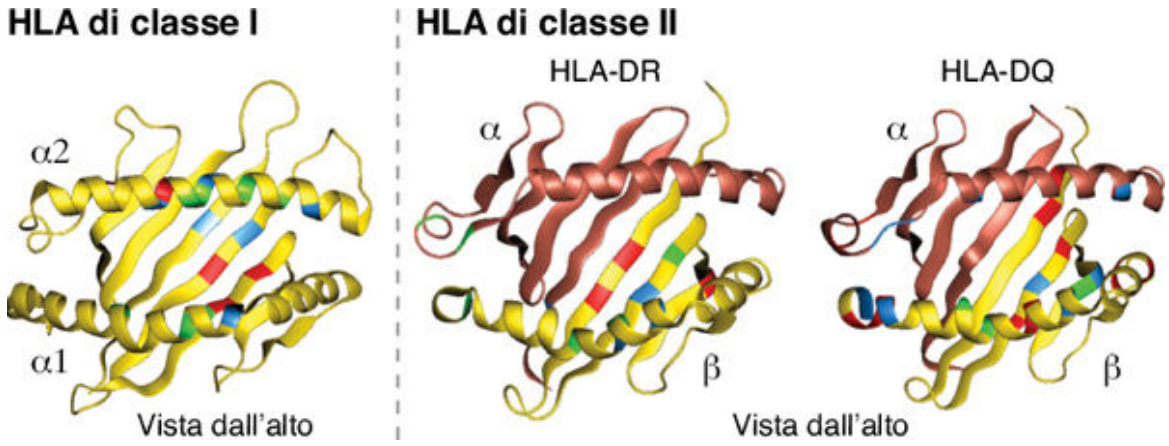


FIGURA 6-11 Residui polimorfi di una molecola MHC. I residui polimorfi delle molecole di classe I e II sono localizzati nella tasca per il legame dei peptidi e nelle α-eliche attorno alla tasca. Le regioni di maggiore variabilità dei diversi alleli HLA sono indicate in *rosso*, quelle di variabilità intermedia in *verde* e quelle di variabilità minore in *blu*. (*Riprodotta per gentile concessione di Margulies DH, Natarajan K, Rossjohn J, McCluskey J: Major histocompatibility complex [MHC] molecules: structure, function, and genetics. In Paul WE [ed]: Fundamental immunology, 6th ed, Philadelphia, 2008, Lippincott Williams & Wilkins.*)

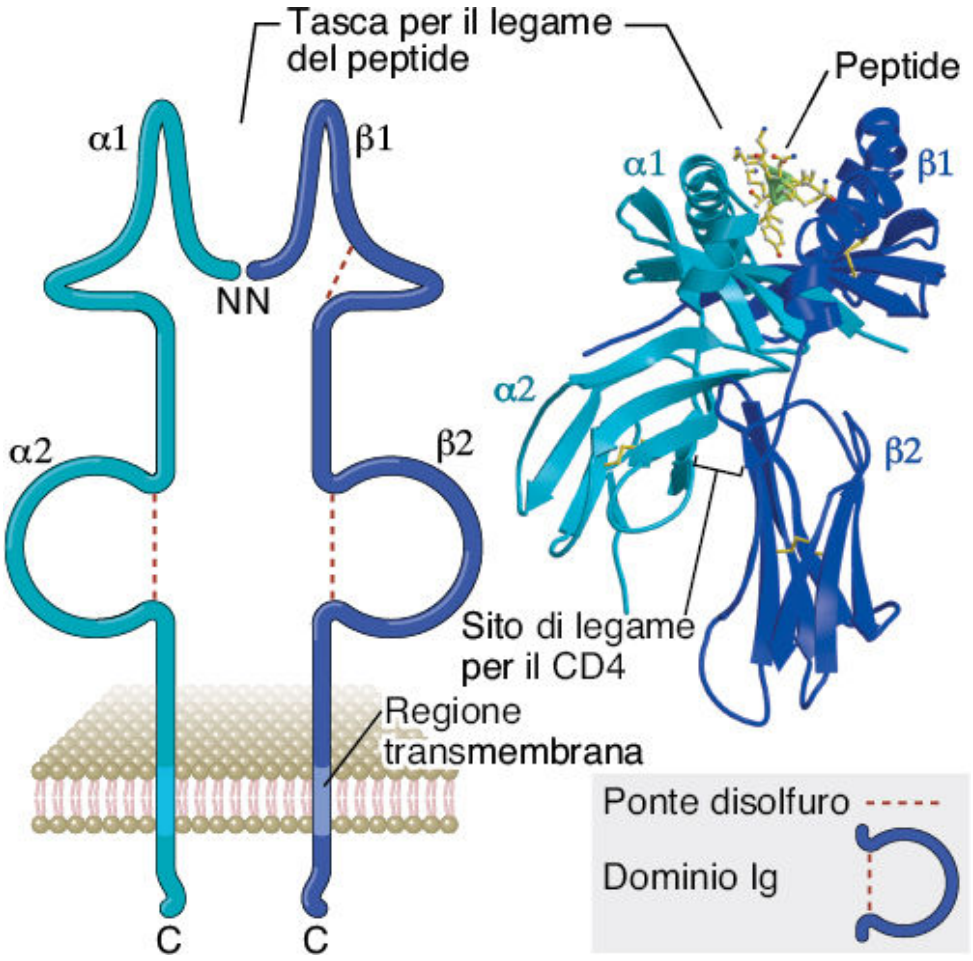


FIGURA 6-12 Struttura delle molecole MHC di classe II. Il disegno (*a sinistra*) illustra schematicamente le differenti regioni della molecola MHC (non in scala). Le molecole di classe II sono composte da una catena α polimorfa unita in modo non covalente a una catena β polimorfa. Entrambe le catene sono glicosilate; i carboidrati non sono mostrati. Il modello strutturale (*a destra*) evidenzia la struttura della porzione extracellulare della molecola HLA-DR1 con un peptide legato, svelato dalla cristallografia a raggi X. (*Per gentile concessione del Dr. P. Bjorkman, California Institute of Technology, Pasadena, California*.)

I segmenti α2 e β2 delle molecole di classe II, come il segmento α3 e la β_2-microglobulina nell'MHC di classe I, sono ripiegati in domini Ig e non sono polimorfi, cioè non variano tra i diversi alleli del gene. Sia i domini α2 che β2 delle molecole di classe II contribuiscono alla formazione della concavità che accoglie una protusione dalla proteina CD4, rendendo possibile il legame. Le estremità carbossiterminali dei segmenti α2 e β2 proseguono in piccole regioni di connessione seguite da segmenti di residui transmembrana idrofobici composti da circa 25 aminoacidi. In entrambe le catene, le regioni transmembrana terminano con residui di aminoacidi basici, seguiti da una breve coda citoplasmatica idrofila.

La molecola di classe II completamente assemblata è un trimero composto da una catena α, una catena β e un peptide legato; l'espressione stabile delle molecole di classe II sulla superficie cellulare richiede la presenza di tutte e tre le componenti del trimero. Come nelle molecole di classe I, questo assicura che le molecole MHC che finiscono sulla superficie cellulare siano le molecole che svolgono la loro normale funzione di presentazione dell'antigene.

L'uomo eredita da ogni genitore un gene *DPA* e un gene *DPB*, ognuno dei quali codifica rispettivamente le catene α e β della molecola HLA-DP; un gene funzionale *DQA* e uno *DQB*; un gene *DRA* e uno o due geni funzionali DRB. Così, ogni individuo eterozigote eredita 6 o 8 alleli per l'MHC di classe II, 3 o 4 da ogni genitore (un set di DPe DQ da ogni genitore e uno o due di DR). Di solito l'accoppiamento di proteine MHC da loci diversi (per esempio DRα con DQβ ecc.) non si verifica e quindi ogni aplotipo è spesso trasmesso insieme. Ci sono tuttavia aplotipi che contengono loci DRB extra che producono catene β che si associano poi con DRα, e alcune molecole DQα codificate su un cromosoma possono associarsi con molecole DQβ codificate sull'altro cromosoma. Questa situazione fa sì che il numero delle molecole di classe II espresse possa essere superiore a 8.

Legame dei peptidi alle molecole MHC

Dopo aver compreso che l'immunogenicità delle proteine dipende dalla capacità dei loro peptidi di essere esposti sulle molecole MHC, un considerevole sforzo è stato dedicato a chiarire le basi molecolari dell'interazione MHC-peptide e le caratteristiche dei peptidi che permettono loro di legarsi. Questi studi inizialmente hanno preso le mosse da test funzionali basati sull'utilizzo di linfociti T helper e CTL stimolati con cellule APC caricate con peptidi diversi. Il legame dei peptidi alle molecole MHC è stato studiato utilizzando molecole MHC purificate e peptidi marcati con sonde fluorescenti o radioattivi utilizzando tecniche di dialisi all'equilibrio e filtrazione molecolare. L'analisi cristallografica a raggi X dei complessi peptide-MHC ha fornito informazioni definitive su come i peptidi alloggiano nella tasca delle molecole MHC e sui residui che in ciascuna struttura partecipano a questo legame. Nel paragrafo seguente vengono riassunte le caratteristiche principali dell'interazione tra peptidi e molecole MHC di classe I o II.

Caratteristiche dell'interazione peptide-MHC

Le molecole MHC mostrano una certa promiscuità di legame, mentre la specificità del riconoscimento dell'antigene risiede in massima parte nella selettività dei recettori dei linfociti. In altre parole, un singolo allele MHC, per esempio HLA-A2, può presentare uno o più peptidi diversi ai linfociti T, ma un linfocita T riconoscerà soltanto uno dei numerosi complessi HLA-A2/peptide possibili. Le interazioni tra le molecole MHC e gli antigeni peptidici sono caratterizzate da molti aspetti importanti.

- ***Ogni molecola MHC di classe I o II possiede una singola tasca che lega un peptide alla volta, anche se ogni molecola MHC può legare più peptidi in tempi diversi***. La capacità di ogni molecola MHC di legare peptidi diversi è stata dimostrata con vari approcci sperimentali. Inizialmente si era osservato che peptidi diversi che legano la stessa molecola MHC possono inibire in modo competitivo la presentazione degli altri, mettendo in evidenza che in ogni molecola MHC c'è una sola singola tasca che lega il peptide. Lo studio della struttura cristallina delle molecole MHC di classe I e II ha confermato la presenza di una singola tasca per il legame del peptide in ciascuna di queste molecole (vedi Figg. 6-10 e 6-12). Non sorprende che una singola molecola MHC possa legare

molteplici peptidi, poiché ciascun individuo contiene soltanto poche molecole MHC (se ne contano 8 di classe I e 10 di classe II in un individuo eterozigote) e queste devono essere in grado di presentare peptidi derivanti da un enorme numero di antigeni proteici.

- ***I peptidi che si legano alle molecole MHC condividono caratteristiche strutturali che favoriscono questa interazione***. Una di queste è la dimensione del peptide. Le molecole di classe I possono accogliere peptidi che hanno una lunghezza di 8-12 residui, mentre le molecole di classe II possono legare peptidi dai 10 ai 30 residui di lunghezza, con una lunghezza ottimale tra i 12 e i 16 residui aminoacidici. Inoltre, i peptidi che si legano a una particolare forma allelica di una molecola MHC contengono residui aminoacidici che permettono interazioni complementari tra il peptide e la forma allelica della molecola MHC. Le caratteristiche di alcuni degli aminoacidi che promuovono il legame alle molecole MHC sono descritti più avanti, nella sezione in cui discuteremo le basi strutturali delle interazioni peptide-MHC. I residui di un peptide che si lega alle molecole MHC sono diversi da quelli che sono riconosciuti dai linfociti T.
- ***Le molecole MHC legano il peptide durante la loro sintesi e il loro assemblaggio avviene all'interno della cellula***, perciò le molecole MHC mostrano peptidi provenienti da microbi che sono all'interno della cellula ospite e questo è il motivo per cui i linfociti T ristretti per MHC riconoscono i microbi associati alle cellule e sono responsabili delle risposte mmunitarie verso i microbi intracellulari. È importante notare che alle molecole MHC di classe I si associano i peptidi provenienti principalmente da proteine citosoliche, mentre a quelle di classe II si associano peptidi provenienti dalle proteine delle vescicole intracellulari. I meccanismi e il significato di questi processi verranno discussi più avanti in questo capitolo.
- ***L'associazione tra i peptidi e le molecole MHC è un'interazione saturabile, con una velocità di dissociazione molto lenta***. Nella cellula diverse chaperonine e diversi enzimi facilitano il legame tra il peptide e la molecola MHC (vedi più avanti). Una volta formati, i complessi peptide-MHC sono stabili e le costanti di dissociazione indicano una lunga emivita del complesso, che va da alcune ore a molti giorni. La straordinaria lentezza di dissociazione consente al peptide di essere esposto sulla superficie del complesso MHC-peptide per un tempo

sufficientemente lungo da favorire il riconoscimento da parte di un linfocita T dotato della corretta specificità.

- ***Quantità molto piccole di complessi peptide-MHC sono in grado di attivare i linfociti T specifici***. Le APC presentano in continuazione peptidi derivati dalle diverse proteine che incontrano, ne consegue che solo una piccola frazione dei complessi peptide-MHC espressi sulla superficie cellulare contengono lo stesso peptide. È stato valutato che un linfocita T può essere attivato da un centinaio di complessi MHC di classe II contenenti un particolare peptide. Questo numero è inferiore allo 0,1% di tutte le molecole di classe II espresse da una APC.
- ***Le molecole MHC di un individuo non discriminano tra peptidi estranei (per esempio quelli che derivano da proteine microbiche) e peptidi che originano da proteine dello stesso individuo (antigeni self)***. Così, le molecole MHC espongono sia peptidi self sia peptidi non-self e sono i linfociti T a discriminare il riconoscimento degli antigeni non-self. In effetti, se i peptidi presentati normalmente dalle APC vengono purificati, si può osservare che la maggior parte di questi proviene da proteine self. L'incapacità delle molecole MHC di discriminare tra self e non-self pone due questioni. In primo luogo, se normalmente le APC presentano prevalentemente complessi MHC-peptide self, come può un linfocita T riconoscere e attivarsi solo in risposta agli antigeni non-self? La risposta, come già accennato, risiede nel fatto che i linfociti T sono estremamente sensibili e per la loro attivazione sono sufficienti pochi complessi MHC-peptide. Quindi un nuovo antigene introdotto nell'organismo può essere processato e ridotto a peptidi caricati in un numero di molecole MHC sufficiente ad attivare linfociti T specifici per quell'antigene, nonostante il fatto che la maggior parte delle molecole MHC sia occupata da peptidi self. Inoltre, i microbi (la fonte naturale di molti antigeni non-self) aumentano l'efficienza della presentazione dell'antigene e inducono l'espressione dei secondi segnali. In secondo luogo, se i peptidi self vengono continuamente processati e presentati in associazione alle molecole MHC, perché un individuo non sviluppa risposte contro le proteine self? La risposta a questa domanda sta nel fatto che i complessi peptide-MHC che si formano non inducono autoimmunità, perché i linfociti T specifici per antigeni self vengono uccisi o inattivati. Quindi, normalmente, i linfociti T non rispondono agli antigeni self (vedi Cap. 15).

Basi strutturali del legame dei peptidi alle molecole MHC

Il legame dei peptidi alle molecole MHC è un'interazione non covalente tra i residui presenti nei peptidi e quelli contenuti nella tasca delle molecole MHC. Come vedremo in seguito, gli antigeni proteici vengono tagliati proteoliticamente dalle cellule che presentano l'antigene per generare i peptidi che saranno legati ed esposti dalle molecole MHC. I peptidi si legano alla tasca delle molecole MHC prendendo una conformazione estesa. Una volta legati, i peptidi e le molecole d'acqua a essi associate riempiono la tasca, prendendo estesi contatti con i residui aminoacidici del foglietto β del pavimento e le α-eliche delle pareti della tasca (Fig. 6-13). Nel caso delle molecole MHC di classe I, l'associazione di un peptide con il *cleft* dell'MHC dipende dalle interazioni elettrostatiche della porzione amino(N)-terminale del peptide, carica positivamente, e di quella carbossi(C)-terminale, carica negativamente. Nella maggioranza delle molecole MHC, il foglietto β del pavimento della tasca contiene delle nicchie dove si legano i residui dei peptidi. Molte molecole MHC di classe I possiedono una nicchia idrofobica che riconosce al C-terminale del peptide un aminoacido idrofobico (valina, isoleucina, leucina o metionina). Alcune molecole di classe I preferiscono residui basici al C-terminale, quali lisina o arginina. Inoltre, altri residui aminoacidici di un peptide possono contenere catene laterali che si adattano perfettamente a nicchie specifiche e che si legano ad aminoacidi complementari nella molecola MHC mediante interazioni elettrostatiche (ponti salini), legami idrogeno o interazioni di van der Waals. Tali residui sono chiamati *residui àncora*, dal momento che sono i maggiori responsabili del legame (cioè ancorano il peptide nella tasca della molecola MHC). I residui àncora possono essere localizzati al centro o all'estremità del peptide. Ciascun peptide legato all'MHC generalmente contiene solo uno o due residui àncora e questo presumibilmente permette una maggiore variabilità negli altri residui, precisamente in quelli che saranno riconosciuti dai linfociti T specifici. Nel caso del legame di alcuni peptidi alle molecole MHC, specialmente a quelle di classe II, i ponti di idrogeno o i ponti ionici contribuiscono alle interazioni dei peptidi con le α-eliche delle pareti laterali della tasca MHC. Le molecole MHC di classe II possono legare peptidi più grandi di quelli legati dalle molecole di classe I. In questo caso, i peptidi fuoriescono da entrambe le estremità del *cleft*.

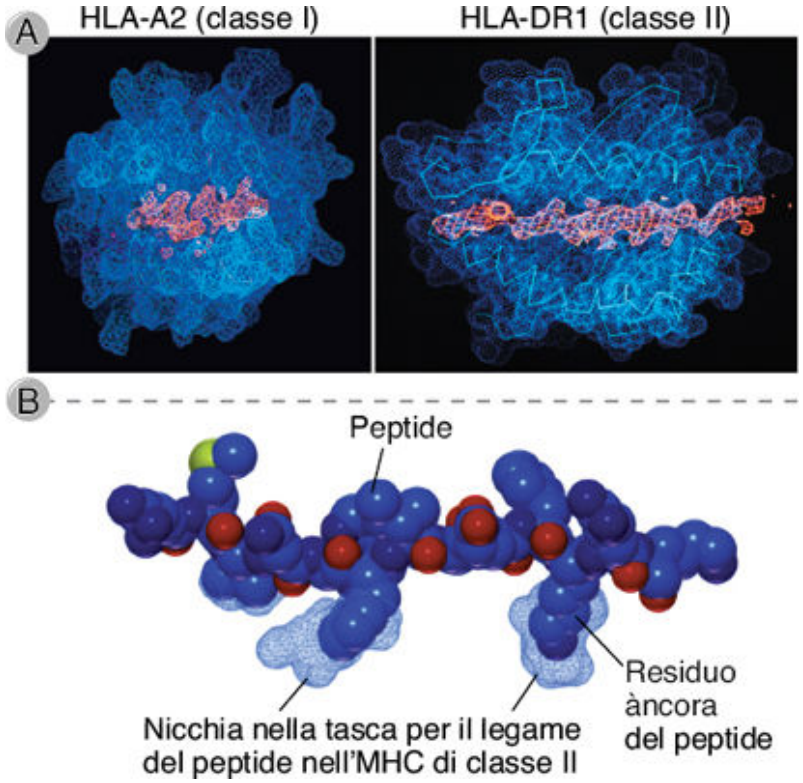


FIGURA 6-13 Legame del peptide alle molecole MHC. A. Questa visione dall'alto delle strutture cristalline delle molecole MHC mostra in che modo i peptidi giacciono sul pavimento della tasca per il legame del peptide. La molecola di classe I mostrata è HLA-A2 e la molecola di classe II è HLA-DR1. La tasca della molecola di classe I è chiusa, mentre quella della classe II è aperta. Questo fa sì che le molecole di classe II accolgono peptidi più lunghi rispetto alle molecole di classe I. **B.** La vista laterale di un peptide legato a una molecola MHC di classe II mostra il modo in cui i residui àncora del peptide si infilano nelle nicchie della tasca della molecola MHC. (***A***, *Riprodotta per gentile concessione di Macmillan Publishers Ltd. Da Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC: Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. Nature 329:506–512, 1987; e Brown J, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC: Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. Nature 364:33-39, 1993.* ***B****, Da Scott CA, Peterson PA, Teyton L, Wilson IA: Crystal structures of two I-A^{d}–peptide complexes reveal that high affinity can be achieved without large anchor residues. Immunity 8:319–329, 1998. Copyright © 1998, per concessione di Elsevier Science.*)

Dato che molti residui all'interno e intorno alla tasca dell'MHC sono polimorfi (cioè differiscono tra diversi alleli MHC), alleli differenti favoriscono il legame di diversi peptidi. Queste sono le basi strutturali della funzione dei geni MHC come "geni della risposta immunitaria". Solo gli individui che esprimono alleli MHC che possono legarsi a un particolare peptide e presentarlo ai linfociti T sono in grado di rispondere a questo peptide.

I recettori per l'antigene dei linfociti T riconoscono sia l'antigene peptidico sia le molecole MHC; dai residui dei peptidi dipende la specificità del riconoscimento e dai residui MHC dipende la restrizione MHC dei linfociti T. Una parte del peptide legato viene esposta dall'apertura superiore della tasca delle molecole MHC; le catene aminoacidiche della parte esposta vengono riconosciute dai recettori per l'antigene di linfociti T specifici. Il recettore del linfocita T interagisce con i residui polimorfi delle α-eliche della molecola MHC stessa (vedi Fig. 6-1). Le variazioni nel peptide e nella tasca per il legame della molecola MHC sono perciò in grado di alterare la presentazione del peptide stesso o il suo riconoscimento da parte dei linfociti T. Infatti, si può aumentare l'immunogenicità di un peptide tramite l'incorporazione di un residuo che rafforzi il suo legame alle molecole MHC comunemente ereditate in una data popolazione.

Dal momento che le molecole MHC possono legare solo peptidi, ci deve essere un modo attraverso cui gli antigeni proteici di grandi dimensioni vengono trasformati in peptidi. Questo tipo di trasformazione è chiamata **processazione dell'antigene** ed è l'argomento che verrà trattato nel resto di questo capitolo.

PROCESSAZIONE DEGLI ANTIGENI PROTEICI

Le vie di processazione dell'antigene trasformano gli antigeni proteici presenti nel citosol o internalizzati dall'ambiente extracellulare in peptidi e inseriscono questi peptidi nelle molecole MHC per presentarli ai linfociti T (Fig. 6-14). I meccanismi cellulari di processazione dell'antigene sono deputati a generare peptidi che hanno le caratteristiche strutturali adatte per associarsi alle molecole MHC e per disporre tali peptidi in un compartimento cellulare compatibile con quello in cui si trovano le molecole MHC di nuova formazione dotate di una tasca per legarli. L'associazione del peptide alla molecola MHC avviene prima che questa venga espressa sulla superficie cellulare e rappresenta un componente della biosintesi e dell'assemblaggio delle molecole MHC. Infatti, come già detto, l'associazione del peptide è necessaria per un assemblaggio stabile e per l'espressione delle molecole sia di classe I sia di classe II.

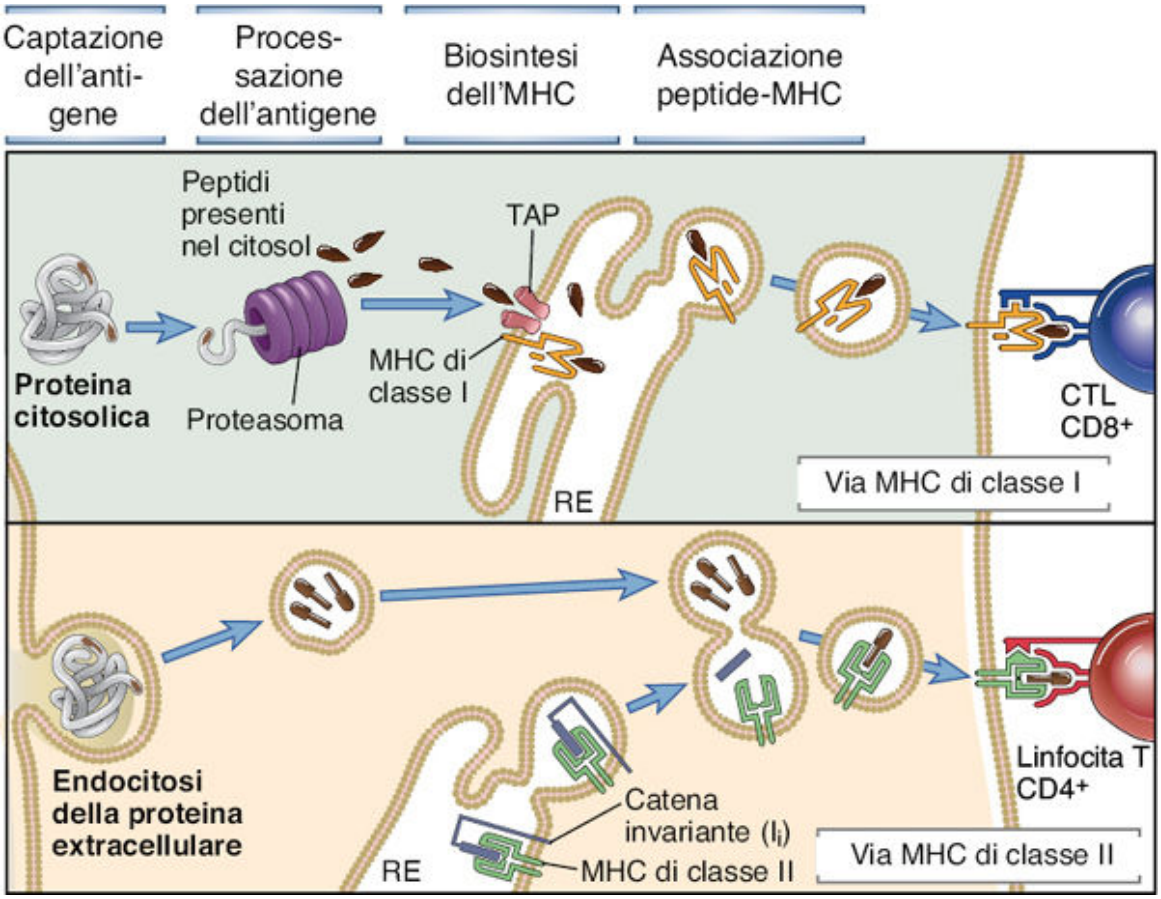


FIGURA 6-14 Vie di presentazione e processazione dell'antigene. Nella via MHC di classe I (*in alto*), gli antigeni proteici nel citosol sono processati dal proteasoma e i peptidi sono trasportati nel reticolo endoplasmatico (RE), dove si legano alle molecole MHC di classe I. Nella via MHC di classe II (*in basso*), gli antigeni proteici extracellulari sono endocitati e processati nelle vescicole; i peptidi si legano a molecole MHC di classe II. I dettagli di questo processo sono mostrati nelle Figure 6-16 e 6-17.

Gli antigeni proteici presenti nel citosol (in genere sintetizzati dalla cellula) danno origine a peptidi associati a MHC di classe I che vengono riconosciuti dai linfociti T CD8+, mentre gli antigeni provenienti dall'ambiente extracellulare che vengono internalizzati nelle vescicole delle APC generalmente danno origine a peptidi associati alle molecole MHC di classe II e sono riconosciuti dai linfociti T CD4+. Il diverso destino degli antigeni vescicolari e citosolici è dovuto alla segregazione delle vie di biosintesi e di assemblaggio delle molecole MHC di classe I e di classe II (vedi Fig. 6-14 e Tab. 6-5). La differenza fondamentale tra le vie MHC di classe I e di classe II risiede principalmente nel sito della degradazione dei peptidi. Le proteine che si degradano nei proteasomi, molte delle quali sono di origine citosolica, generano peptidi per le molecole MHC di classe I. Solo le

proteine che sono degradate negli endo-lisosomi generano peptidi per le molecole MHC di classe II. La differenza fondamentale tra antigeni vescicolari e citosolici è stata dimostrata sperimentalmente analizzando la presentazione di uno stesso antigene introdotto all'interno di un'APC in diversi modi (Fig. 6-15). Se un antigene proteico viene generato nel citoplasma dell'APC come prodotto di un gene trasfettato o introdotto artificialmente nel citoplasma per shock osmotico, i peptidi che derivano da questa proteina sono presentati dalle molecole MHC di classe I e sono riconosciuti da linfociti T $CD8^+$. Se invece la stessa proteina viene endocitata dalle APC, i peptidi da essa derivati (che possono essere differenti da quelli presentati dalle molecole MHC di classe I) vengono presentati da molecole di classe II e sono riconosciuti da linfociti T $CD4^+$.

Verranno ora descritte prima le due vie di processazione dell'antigene e poi il loro significato funzionale.

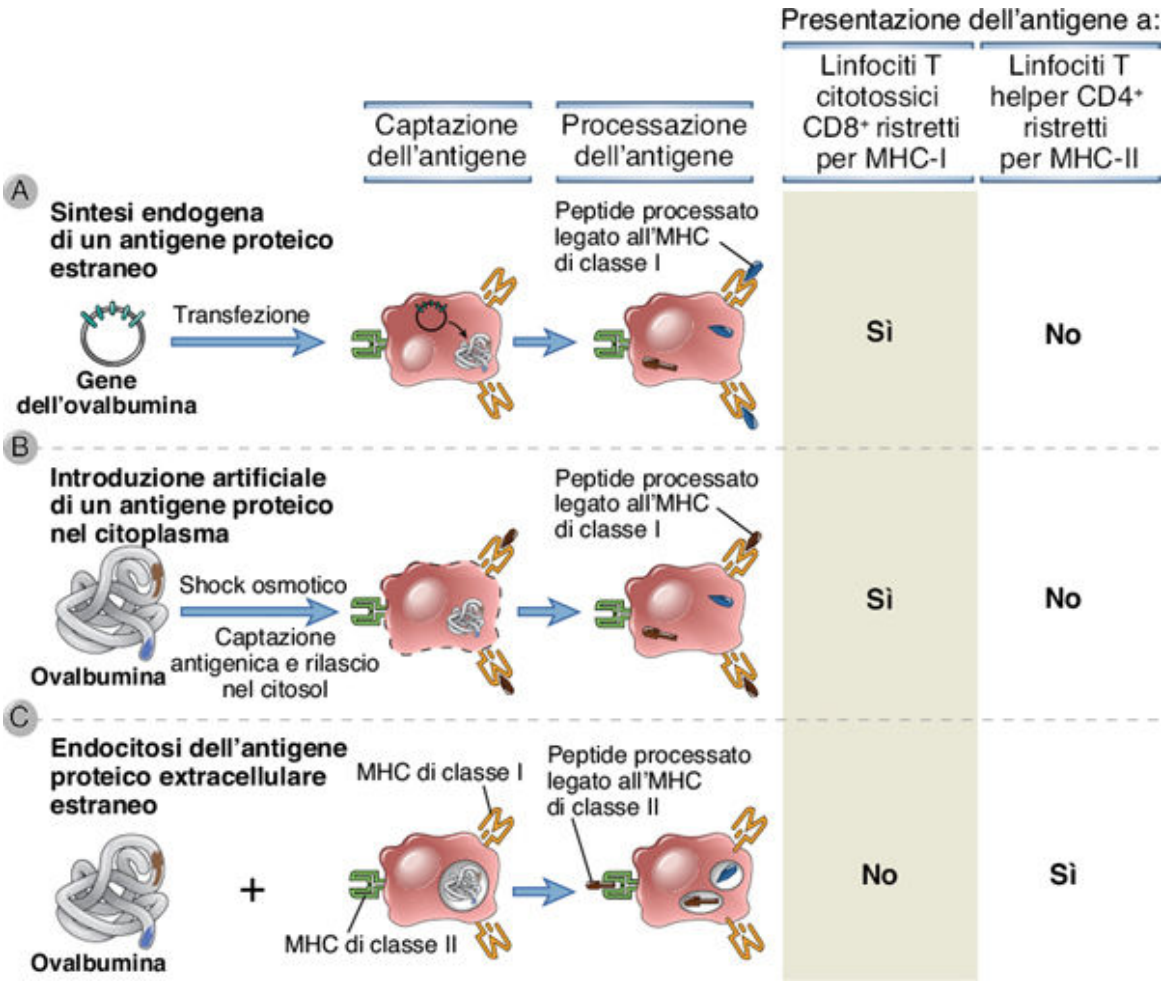
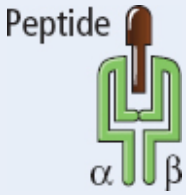


FIGURA 6-15 Dimostrazione sperimentale della presentazione di antigeni extracellulari e citosolici. Quando una proteina-modello come l'ovalbumina è sintetizzata a livello intracellulare come risultato della transfezione del suo gene modificato in modo da dare origine a una proteina che manca all'*N*-terminale delle sequenze segnale (**A**) oppure quando è introdotta nel citoplasma attraverso membrane rese permeabili da shock osmotico (**B**), i peptidi che ne derivano sono presentati in associazione con molecole MHC di classe I. Quando l'ovalbumina è aggiunta come antigene extracellulare a un'APC che esprime entrambe le molecole MHC, i peptidi che ne derivano sono presentati solo in associazione con molecole MHC di classe II (**C**). La risposta dei CTL, ristretta per MHC di classe I, si valuta come uccisione delle cellule che esprimono l'antigene e la risposta dei linfociti T helper, ristretti per MHC di classe II, si valuta come secrezione di citochine.

TABELLA 6-5 Paragone delle vie di processazione e presentazione dell'antigene su MHC di classe I e II

Caratteristica	Via dell'MHC di classe I	Via dell'MHC di classe II
Composizione del complesso peptide-MHC	Catena polimorfa α, β_2-microglobulina, peptide	Catene polimorfe α e β, peptide 
Tipi di APC	Tutte le cellule nucleate	Cellule dendritiche, fagociti mononucleati, linfociti B; cellule endoteliali, epitelio timico
Linfociti T responsivi	Linfociti T $CD8^+$	Linfociti T $CD4^+$
Fonte degli antigeni	Principalmente proteine citosoliche (generalmente sono sintetizzate nella cellula; possono anche entrare nel citosol dai fagosomi); anche proteine nucleari e di membrana	Proteine endosomiali/lisosomiali (la maggior parte internalizzate dall'ambiente extracellulare)
Enzimi responsabili della generazione dei peptidi	Proteasomi	Proteasi endosomiali e lisosomiali (per esempio le catepsine)
Sito di caricamento del peptide sull'MHC	Reticolo endoplasmatico	Compartimento vescicolare specializzato
Molecole coinvolte nel trasporto dei peptidi e nel caricamento delle molecole MHC	Chaperonine, TAP nel RE	Chaperonine nel RE; catena invariante nel RE, nel Golgi e nel MIIC/CIIV; DM

APC (*Antigen-Presenting Cell*), cellula che presenta l'antigene; CIIV (*Class II Vesicle*), vescicola di classe II; MHC (*Major Histocompatibility Complex*), complesso maggiore di istocompatibilità; MIIC (*MHC class II Compartment*), compartimento MHC di classe II; RE, reticolo endoplasmatico; TAP

(*Transporter associated with Antigen Processing*), trasportatore associato con la processazione dell'antigene.

MHC di classe I, processazione e presentazione delle proteine citosoliche

I peptidi associati all'MHC di classe I sono generati nei proteasomi attraverso la degradazione di proteine citosoliche. Questi peptidi sono poi trasportati nel reticolo endoplasmatico (RE), dove si legano a molecole MHC di classe I neosintetizzate. Questa sequenza di eventi è illustrata nella Figura 6-16 e le singole tappe sono descritte di seguito.

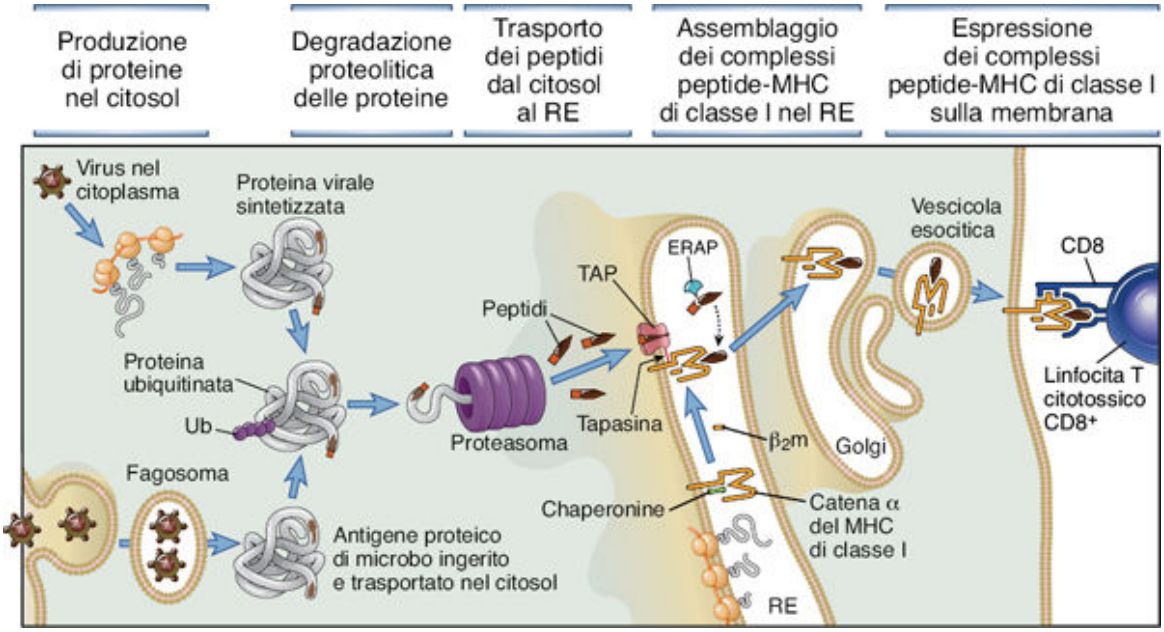


FIGURA 6-16 Via di presentazione dell'antigene attraverso MHC di classe I. Gli stadi che caratterizzano la processazione delle proteine citosoliche sono descritti nel testo. β_2m, β_2-microglobulina; ERAP (*Endoplasmic Reticulum Associated Peptidase*), aminopeptidasi associata al reticolo endoplasmatico; RE, reticolo endoplasmatico; TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*), trasportatore associato alla processazione degli antigeni; Ub, ubiquitina.

Generazione di antigeni proteici nel citosol

Molti antigeni proteici citosolici sono sintetizzati dalle cellule, altri provengono da meccanismi di secrezione batterica e altri ancora sono fagocitati e trasportati dai fagolisosomi al citosol. Gli antigeni presenti nel citoplasma possono essere il prodotto di virus, batteri, o altri microbi intracellulari che hanno infettato la cellula. Nelle cellule tumorali, i geni mutati o iperespressi possono produrre antigeni proteici che sono riconosciuti dai

CTL ristretti per classe I (vedi Cap. 18). I peptidi presentati in associazione con le molecole MHC di classe I possono anche derivare da microbi o altri antigeni particolati che sono stati internalizzati nei fagosomi ma sono poi finiti nel citosol. Alcuni microbi sono in grado di danneggiare le membrane dei fagosomi e di praticare dei pori attraverso i quali i microbi e i loro antigeni passano nel citosol. Per esempio, i ceppi patogeni di *Listeria monocytogenes* producono una proteina, denominata *listeriolisina*, che permette ai batteri di passare dalle vescicole al citosol. (Tale fuoriuscita è un meccanismo che i batteri hanno sviluppato per resistere all'uccisione da parte di meccanismi microbicidi dei fagociti, gran parte dei quali sono limitati ai fagolisosomi.) Una volta che gli antigeni dei microbi fagocitati sono nel citosol, vengono processati come gli altri antigeni citosolici. Nelle DC alcuni antigeni che sono stati ingeriti nelle vescicole entrano poi nella via citosolica degli MHC di classe I: questo processo è chiamato *cross-presentazione* e sarà descritto più avanti.

Sebbene le proteine microbiche che sono presentate dalle molecole MHC di classe II, siano tipicamente citosoliche, anche le proteine provenienti da altri compartimenti cellulari possono entrare in tale via di presentazione. Infatti i peptidi segnale caratteristici delle proteine di membrana e di quelle secrete sono generalmente tagliati da parte di peptidasi e degradati proteoliticamente subito dopo la loro sintesi e il trasferimento nel RE. Questo processo genera peptidi in grado di legare MHC di classe I senza il bisogno di alcuna ulteriore degradazione proteolitica. Inoltre, le proteine nucleari possono essere processate da parte dei proteasomi nel nucleo e presentate in associazione di molecole MHC di classe I.

Degradazione proteolitica delle proteine nei proteasomi

Il meccanismo principale per la generazione dei peptidi a partire da proteine nucleari e presenti nel citosol è la proteolisi da parte del proteasoma. I proteasomi sono complessi enzimatici multiproteici di grosse dimensioni con un'attività proteolitica ad ampio spettro che si trovano nel citoplasma della maggior parte delle cellule. Il proteasoma si presenta come un cilindro composto da due anelli β interni e due anelli α esterni coassiali. Ciascun anello è a sua volta formato da 7 subnita, con una testa a ogni estremità del cilindro. Le proteine degli anelli esterni α sono strutturali e non hanno attività

proteolitica; 3 (β1, β2 e β5) delle 7 subunità degli anelli β più interni, costituiscono i siti catalitici per la proteolisi.

Il proteasoma svolge normalmente una funzione di manutenzione, degradando le proteine citoplasmatiche danneggiate o che non hanno assunto la corretta conformazione. La sintesi proteica è in genere un processo molto rapido, ogni secondo vengono introdotti 6-8 residui aminoacidici nelle molecole che si stanno allungando. Questo processo è altamente suscettibile agli errori e si è stimato che circa il 20% delle proteine neosintetizzate assuma una conformazione errata. I polipeptidi neo-trascritti ma difettosi, così come le proteine che sono danneggiate da stress cellulare, vengono degradati nei proteasomi, in seguito al legame covalente di diverse copie di un piccolo polipeptide chiamato *ubiquitina*. Le proteine ubiquinate, con catene di 4 o più ubiquitine, in seguito al loro riconoscimento da parte della testa del proteasoma, perdono la loro normale conformazione, vengono liberate dall'ubiquitina, "tritate" e degradate a peptidi. Il proteasoma ha una specificità di substrato molto ampia e può generare una grande varietà di peptidi a partire dalle proteine citosoliche (di solito la degradazione non arriva ai singoli aminoacidi). È interessante notare che nelle cellule trattate con la citochina IFN-γ vi è un aumento della trascrizione e della sintesi di tre nuove subunità catalitiche del proteasoma, note come β1i, β2i e β5i, che vanno a rimpiazzare le altre tre subunità catalitiche dell'anello β del proteasoma. Questo provoca una modificazione nella specificità per il substrato, così che i peptidi generati contengono generalmente aminoacidi idrofobici al C-terminale, come leucina, valina, isoleucina e metionina, e residui basici, quali lisina e arginina. Questi tipi di C-terminale sono tipici dei peptidi trasportati nella via dell'MHC di classe I. Questo è uno dei meccanismi attraverso cui l'IFN-γ promuove la presentazione dell'antigene, in associazione all'aumento dell'espressione delle molecole di classe II (vedi Fig. 6-9). I proteasomi sono dunque organuli che svolgono una funzione basilare nel metabolismo cellulare che si sono adattati a un ruolo specializzato come quello della presentazione dell'antigene.

Trasporto dei peptidi dal citosol al reticolo endoplasmatico

I peptidi generati dai proteasomi sono trasportati da uno speciale trasportatore nel RE, dove le molecole MHC di classe I neosintetizzate sono disponibili per il legame. Dal momento che gli antigeni peptidici destinati alla via della classe I sono generati dalle proteasi presenti nel citosol o nel nucleo,

ma le molecole MHC di classe I sono sintetizzate nel RE, deve esistere un meccanismo che traslochi i peptidi dal citosol al RE. Questo trasferimento è mediato da un dimero proteico chiamato *trasportatore associato con la processazione dell'antigene* (*Transporter associated with Antigen Processing*, TAP), che è un membro della famiglia del trasportatore ABC, che codifica per le proteine, molte delle quali deputate al trasporto ATP-dipendente di molecole a basso peso molecolare attraverso le membrane cellulari. La proteina TAP è localizzata prevalentemente nel RE dove è responsabile del trasporto attivo, ATP-dipendente, dei peptidi dal citosol al lume del RE. L'eterodimero TAP, sebbene abbia un'ampia specificità, trasporta in maniera ottimale peptidi che oscillano tra 8 e 16 aminoacidi in lunghezza, contenenti in posizione C-terminale residui basici (nell'uomo) o idrofobici (nell'uomo e nel topo). Come già ricordato, il proteasoma genera peptidi con caratteristiche ideali per il legame alle molecole MHC di classe I.

Sul lato interno della membrana del RE, la proteina TAP è associata a una proteina chiamata *tapasina*, anch'essa dotata di affinità per le molecole MHC di classe I neosintetizzate e vuote. La tapasina porta il trasportatore TAP dove sono localizzate le molecole di classe I in attesa di essere occupate dai peptidi.

Assemblaggio dei complessi peptide-MHC di classe I nel reticolo endoplasmatico

I peptidi trasportati all'interno del RE si legano alle molecole MHC di classe I che sono legate al dimero TAP, attraverso la tapasina. La sintesi e l'assemblaggio delle molecole di classe I presuppongono una sequenza a tappe successive in cui il legame del peptide riveste un ruolo chiave. La catena α di classe I e la β_2-microglobulina sono sintetizzate nel RE. Il ripiegamento appropriato delle catene α nascenti è favorito da varie chaperonine, come la chaperonina di membrana calnexina e la chaperonina del lume calreticolina. All'interno del RE, i dimeri neoformati, ancora "vuoti", di classe I restano legati al complesso TAP. Le molecole MHC vuote di classe I, la tapasina e il trasportatore TAP fanno parte di un più ampio complesso di caricamento del peptide, che comprende anche la calnexina, la calreticulina e altre componenti che partecipano all'assemblaggio e al caricamento del MHC di classe I. I peptidi che entrano nel RE tramite TAP e i peptidi qui prodotti, come le sequenze segnale, sono spesso sminuzzati dalle aminopeptidasi residenti nel RE fino alla dimensione giusta per legare l'MHC. Il peptide è così in grado di

legarsi nella tasca della molecola di classe I. Una volta che le molecole MHC di classe I sono caricate con il peptide, perdono la loro affinità per la tapasina, così il complesso peptide-molecola di classe I si stacca dalla tapasina ed è in grado di uscire dal RE ed essere trasportato sulla superficie cellulare. In assenza del peptide, molti dei dimeri formatisi tra catena α e β_2-microglobulina sono instabili e non possono essere trasportati efficientemente dal RE al complesso del Golgi. Questi complessi MHC di classe I vuoti e con conformazione anomala sono trasportati nel citosol per essere degradati nei proteasomi.

I peptidi trasportati nel RE si legano preferenzialmente a molecole di classe I e non a quelle di classe II, per due ragioni. La prima è che le molecole neosintetizzate di classe I sono attaccate alla parte luminale del complesso TAP e catturano i peptidi rapidamente, a mano a mano che questi vengono trasportati nel RE dal trasportatore TAP. La seconda ragione è che, come si dirà poi, nel RE le tasche che legano i peptidi delle molecole di nuova sintesi di classe II sono bloccate da una proteina chiamata catena invariante.

Espressione dei complessi peptide-MHC di classe I sulla superficie cellulare

Le molecole MHC di classe I con i peptidi legati sono strutturalmente stabili e sono espresse sulla superficie cellulare. I complessi peptide-MHC di classe I, prodotti nel RE, migrano attraverso il complesso di Golgi e sono trasportati alla membrana cellulare da vescicole esocitiche. Una volta espressi sulla superficie cellulare, i complessi peptide-MHC di classe I possono essere riconosciuti dai linfociti T $CD8^+$, con il corecettore CD8 che svolge un ruolo essenziale, legandosi a regioni non polimorfe del MHC. Diversi virus hanno sviluppato nel corso dell'evoluzione meccanismi che interferiscono con l'assemblaggio delle molecole di classe I e con il loro caricamento dei peptidi; questo fatto sottolinea l'importanza di tale meccanismo nell'immunità contro i virus (vedi Cap. 16).

MHC di classe II, processazione e presentazione delle proteine contenute nelle vescicole endocitiche

La generazione di peptidi associati a molecole di classe II a partire da antigeni endocitati presuppone la degradazione proteolitica delle proteine internalizzate e il legame dei peptidi alle molecole MHC di classe II all'interno delle

vescicole. Questa sequenza di eventi è illustrata nella Figura 6-17 e le singole tappe sono descritte qui di seguito.

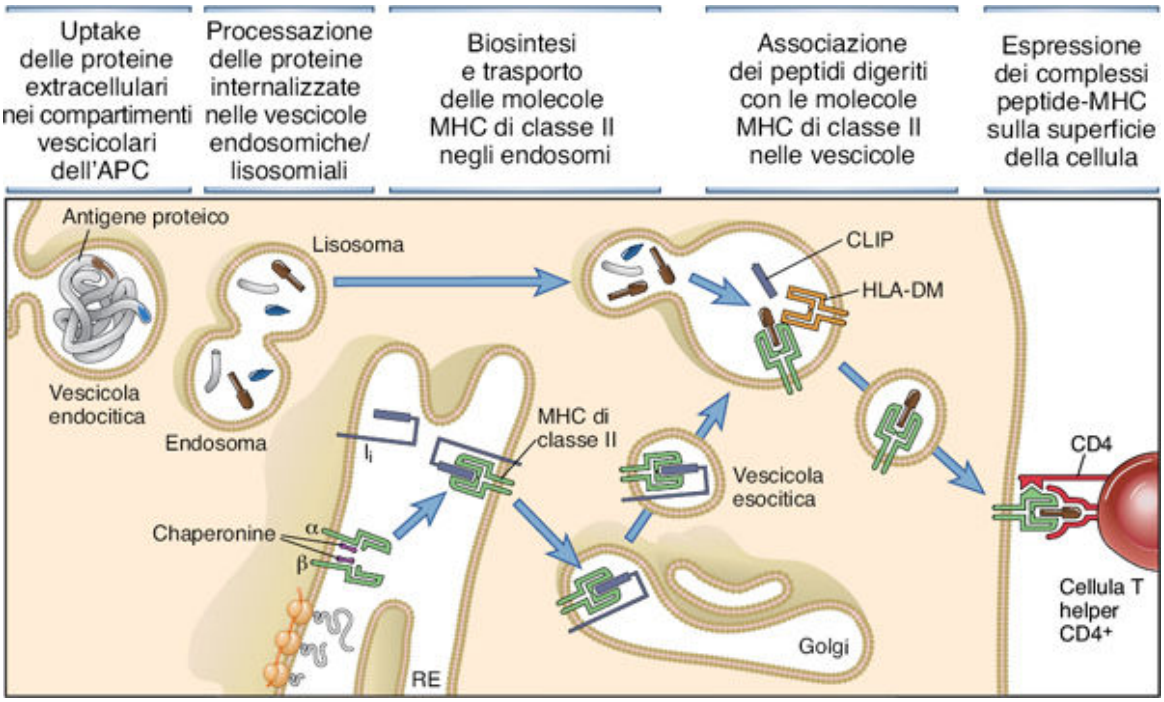


FIGURA 6-17 Via di presentazione dell'antigene in classe II. Gli stadi che caratterizzano la processazione degli antigeni extracellulari sono descritti nel testo. CLIP (*CLass II associated Invariant Peptide*), peptide invariante associato alla classe II; I_i, catena invariante; RE, reticolo endoplasmatico.

Generazione delle proteine nei compartimenti vescicolar

La maggior parte dei peptidi associati all'MHC di classe II deriva da antigeni proteici che sono stati catturati dall'ambiente extracellulare e internalizzati negli endosomi da APC specializzate. La fase iniziale della presentazione di un antigene proteico extracellulare prevede il legame dell'antigene nativo a un'APC e la sua internalizzazione. APC diverse possono legare antigeni proteici in modi diversi e con efficienza e specificità diverse. Le DC e i macrofagi esprimono un'ampia varietà di recettori di superficie che riconoscono strutture condivise da molti microbi (vedi Cap. 4). Le APC usano questi recettori per legare e internalizzare efficacemente i microbi. I macrofagi, inoltre, esprimono recettori per la porzione Fc degli anticorpi e recettori per la proteina C3b del complemento, che possono legare antigeni opsonizzati da anticorpi o proteine del complemento, facilitando la loro fagocitosi. Un altro esempio di recettore specifico espresso sulle APC è

rappresentato dalle immunoglobuline di membrana sui linfociti B che, grazie alla loro elevata affinità per l'antigene, possono mediare molto efficacemente l'internalizzazione di proteine presenti in bassissime concentrazioni nei liquidi extracellulari (vedi Cap. 12).

Dopo la loro internalizzazione, gli antigeni proteici si ritrovano localizzati in vescicole intracellulari rivestite da una membrana, denominate *endosomi*. Gli endosomi sono vescicole a pH acido contenenti enzimi proteolitici. La via endosomiale del traffico delle proteine intracellulari comunica con i lisosomi, che sono vescicole di maggiore densità contenenti enzimi legati alle membrane. Un sottogruppo di endosomi ricchi di molecole di classe II svolge un ruolo del tutto particolare nella processazione e presentazione dell'antigene, che verrà descritto successivamente. I microbi e il materiale corpuscolato vengono internalizzati in vescicole chiamate *fagosomi*, che possono fondersi con i lisosomi producendo vescicole chiamate *fagolisosomi* o *lisosomi secondari*. Alcuni microbi, come i micobatteri e *Leishmania*, possono sopravvivere e persino replicarsi all'interno dei fagosomi o degli endosomi, generando una sorgente persistente di antigene all'interno dei compartimenti vescicolari.

Anche proteine diverse da quelle catturate dal compartimento extracellulare possono entrare nella via dell'MHC di classe II. Alcune proteine destinate alla secrezione possono finire nelle stesse vescicole e venire processate invece di essere secrete. Più raramente proteine citoplasmatiche e di membrana possono essere processate e presentate su molecole MHC di classe II. A volte questo può essere il risultato di un normale processo di turnover del contenuto citoplasmatico, noto con il nome di **autofagia**. In questo percorso, le proteine citoplasmatiche vengono intrappolate in vescicole legate alle membrane, denominate *autofagosomi*; queste vescicole si fondono poi con i lisosomi e le proteine vengono degradate per via proteolitica. I peptidi generati attraverso tale via vengono destinati allo stesso compartimento vescicolare che contiene molecole di classe II, come sono i peptidi derivati da antigeni ingeriti. L'autofagia è prevalentemente un meccanismo per degradare le proteine cellulari e riutilizzarne i prodotti come fonte di nutrimento nei periodi di stress. L'autofagia partecipa anche alla degradazione intracellulare dei microbi, racchiusi nelle vescicole e veicolati ai lisosomi. Si può perciò prevedere che i peptidi generati per autofagia siano presentati ai linfociti T per il riconoscimento. Alcuni peptidi che si associano a molecole MHC di classe II derivano da proteine di membrana che possono così circolare attraverso la

stessa via endocitica esattamente come succede per le proteine extracellulari. Così, anche i virus, che si replicano nel citoplasma delle cellule infettate, possono produrre proteine citoplasmatiche e di membrana che vengono degradate in peptidi e che entrano nella via di presentazione dell'antigene in classe II. Questa via rappresenta quindi un meccanismo di attivazione dei linfociti T helper $CD4^+$ da parte di antigeni virali.

Digestione proteolitica delle proteine presenti nelle vescicole

Le proteine internalizzate vengono degradate enzimaticamente negli endosomi e nei lisosomi generando peptidi che sono in grado di legarsi nelle tasche delle molecole MHC di classe II. La degradazione degli antigeni proteici all'interno delle vescicole è un processo attivo mediato da proteasi che agiscono in modo ottimale a pH acido. Le proteasi maggiormente rappresentate negli endosomi sono le *catepsine*, che sono tiol e aspartilproteasi con ampia specificità di substrato. Diverse catepsine contribuiscono alla generazione di peptidi destinati a entrare nella via di presentazione in classe II. Le proteine parzialmente degradate o frammentate possono anche legarsi nelle tasche delle molecole MHC di classe II per essere poi tagliate enzimaticamente fino a peptidi. Studi di immunomicroscopia elettronica e di frazionamento subcellulare hanno individuato un tipo di endosoma ricco di molecole MHC di classe II, che svolge un ruolo molto importante nella presentazione dell'antigene (Fig. 6-18). Nei macrofagi e nei linfociti B, tale compartimento è chiamato *compartimento MHC di classe II* o MIIC. (In alcuni linfociti B del topo, un organulo simile che contiene molecole di classe II è stato identificato e chiamato *vescicola di classe II*, in sigla CIIV.) Il MIIC al microscopio elettronico ha un aspetto multilamellare caratteristico ed è dotato di tutte le componenti necessarie per l'associazione dei peptidi all'MHC di classe II, compresi gli enzimi che degradano gli antigeni proteici, e di due molecole coinvolte nel caricamento dei peptidi in classe II, cioè la catena invariante e l'HLA-DM, le cui funzioni saranno descritte più avanti.

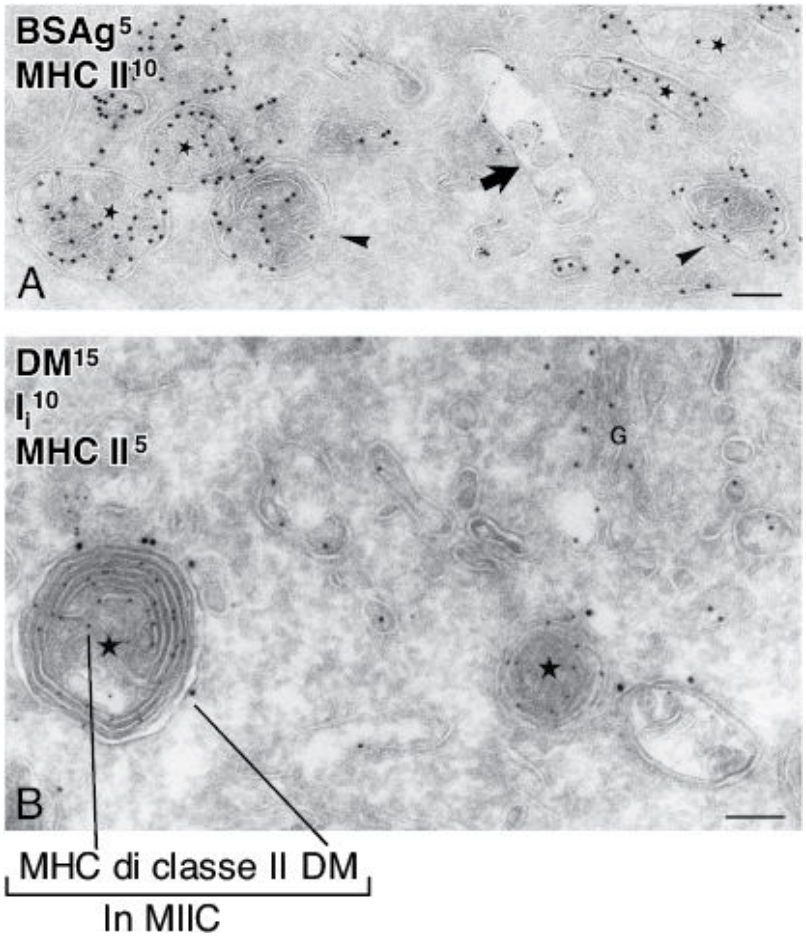


FIGURA 6-18 Morfologia delle vescicole endosomiali ricche di MHC di classe II. A. Immagine in microscopia elettronica di un linfocita B che ha internalizzato la sieroalbumina bovina negli endosomi, marcati con particelle d'oro di 5 nm (*freccia*) e che contengono molecole di classe II, marcate con particelle d'oro di 10 nm nei MIIC (*punte di freccia*). L'albumina internalizzata raggiungerà poi i MIIC. **B.** Immagine in microscopia elettronica di un linfocita B che mostra la localizzazione delle molecole MHC di classe II e DM nei MIIC (*stelle*) e la catena invariante concentrata nel complesso di Golgi (G). In questo esempio, non è evidenziabile nell'MIIC la catena invariante, presumibilmente perché è stata tagliata per generare CLIP. (***A,*** *Da Kleijmeer MJ, Morkowski S, Griffith JM, Rudensky AY, Geuze HJ: Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. Riprodotta da The Journal of Cell Biology 139:639–649, 1997, per gentile concessione di The Rockefeller University Press.* ***B,*** *Per gentile concessione dei Dr. HJ Geuze e M Kleijmeer, Department of Cell Biology, Utrecht University, The Netherlands.*)

Biosintesi e trasporto delle molecole MHC di classe II agli endosomi

Le molecole MHC di classe II sono sintetizzate nel reticolo endoplasmatico e trasportate agli endosomi in forma associata a una proteina denominata catena invariante), che occupa la tasca di legame per il peptide delle molecole MHC di classe II neosintetizzate (Fig. 6-19). Le catene α e β delle

molecole MHC di classe II sono sintetizzate in maniera coordinata e si appaiano a livello del RE. I dimeri nascenti di classe II sono strutturalmente instabili e il loro ripiegamento e assemblaggio vengono favoriti dalle chaperonine presenti nel RE, come la calnexina. La catena invariante, promuove il ripiegamento e l'assemblaggio delle molecole di classe II e le indirizza verso il compartimento vescicolare endosomiale e lisosomiale, dove le proteine internalizzate sono state degradate proteoliticamente in peptidi. La catena invariante è un trimero composto da tre subunità di 30 kD, ciascuna delle quali si lega a un eterodimero αβ MHC di classe II neosintetizzato, bloccando la tasca di legame e impedendo che si leghino altri peptidi. Quindi, le molecole MHC di classe II non possono legare i peptidi presenti nel RE, che restano così disponibili per l'associazione con molecole MHC di classe I (come già descritto). Le molecole MHC di classe II sono trasportate sulla superficie cellulare nelle vescicole esocitiche. Durante questo passaggio, le vescicole esocitiche che veicolano le molecole MHC di classe II fuori dal RE si incontrano e si fondono con le vescicole endocitiche che contengono gli antigeni internalizzati e processati. In questo modo le molecole MHC di classe II incontrano i peptidi antigenici generati dalla proteolisi delle proteine endocitate.

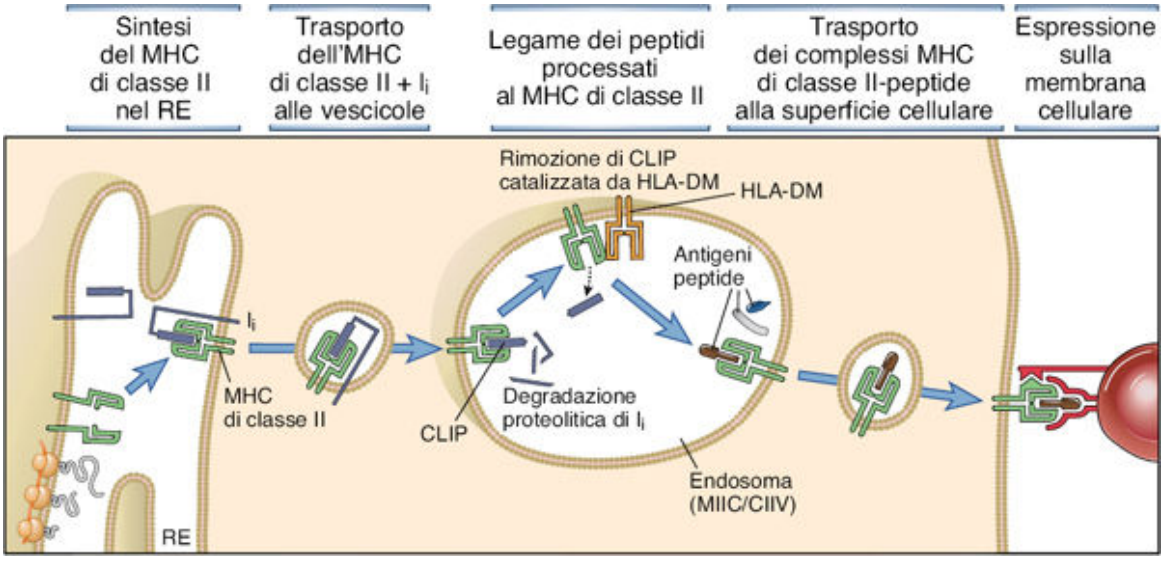


FIGURA 6-19 Funzioni delle catene invarianti e dell'HLA-DM associate alla classe II. Le molecole di classe II legate alla catena invariante (CLIP), vengono trasportate in vescicole, dove I_i viene degradata e CLIP viene rimosso per azione di DM. I peptidi antigenici generati nelle vescicole sono poi in grado di legarsi alle molecole di classe II. Un'altra proteina simile a quelle di classe II, chiamata HLA-DO, può regolare la rimozione di CLIP (non mostrato in figura) catalizzata da DM. CIIV (*Class II Vescicle*), vescicola di classe II.

Associazione dei peptidi processati con le molecole MHC di classe II a livello delle vescicole

Nelle vescicole endosomiali la catena invariante viene rimossa dalle molecole MHC di classe II per l'azione combinata di enzimi proteolitici e della molecola HLA-DM e gli antigeni peptidici possono quindi legarsi alle tasche ora disponibili (vedi Fig. 6-19). Siccome la catena invariante blocca l'accesso alla tasca per il legame dei peptidi, deve essere rimossa prima che possano formarsi complessi peptide-molecole MHC di classe II. Gli stessi enzimi proteolitici, che generano i peptidi dalle proteine endocitate, come le catepsine, agiscono anche sulla catena invariante, degradandola e lasciando solo uno spezzone di 24 aminoacidi denominato *peptide invariante associato alla classe II* (*CLass II-associated Invariant chain Peptide*, CLIP). Quest'ultimo deve essere poi rimosso in modo che la tasca diventi accessibile agli antigeni peptidici prodotti dalle proteine extracellulari. La sua rimozione è mediata da una molecola chiamata HLA-DM (H-2M nel topo), che è codificata nell'MHC, è dotata di una struttura simile a quella delle molecole MHC di classe II e si colocalizza con le molecole MHC di classe II nel compartimento MIIC. Al contrario delle molecole MHC di classe II, le molecole HLA-DM non sono polimorfe e non sono espresse sulla superficie cellulare. L'HLA-DM agisce come uno scambiatore di peptidi, facilitando la rimozione di CLIP e la sua sostituzione con gli antigeni peptidici.

Se negli endosomi sono disponibili peptidi dotati di maggior affinità per l'MHC di classe II, rispetto al CLIP, essi saranno in grado si scalzare il CLIP dalla tasca attraverso il meccanismo di scambio mediato da HLA-DM. Se invece peptidi dotati di maggiore affinità non sono a disposizione, il CLIP resterà legato all'MHC di classe II e queste molecole MHC non subiranno la modificazione conformazionale e la stabilizzazione richiesta per il loro trasferimento sulla superficie cellulare. Dal momento che le estremità della tasca delle molecole di classe II sono aperte, è possibile che si leghino peptidi di grosse dimensioni o anche intere proteine in forma nativa; i peptidi di grandi dimensioni possono essere successivamente tagliati dagli enzimi proteolitici fino a raggiungere la dimensione giusta per essere riconosciuti dai linfociti T. Di conseguenza la dimensione dei peptidi legati a molecole MHC di classe II presenti sulla superficie cellulare è di solito compresa tra 10 e 30 aminoacidi. I peptidi presentati sulle molecole MHC di classe II sono generati prevalentemente da questo processo di sminuzzamento.

Espressione dei complessi peptide-MHC di classe II sulla superficie cellulare

Le molecole MHC di classe II sono stabilizzate dal legame con il peptide e i relativi complessi sono trasportati alla membrana delle APC, dove sono esposti per il riconoscimento da parte dei linfociti T CD4^{+}. Si ritiene che il trasporto dei complessi peptide-MHC di classe II sulla superficie cellulare avvenga per fusione delle estensioni vescicolo-tubulari dei lisosomi con la membrana plasmatica, permettendo l'arrivo sulla superficie cellulare dei complessi caricati con i peptidi. Una volta espressi sulla membrana delle APC, i complessi peptide-classe II vengono riconosciuti dai linfociti T CD4^{+} specifici per l'antigene peptidico, con il corecettore CD4 che ha il ruolo essenziale di legarsi a regioni non polimorfe della molecola di classe II. È interessante notare che, mentre le molecole di classe II caricate con il peptide migrano dal compartimento vescicolare endosomiale e lisosomiale verso la superficie cellulare, altre molecole coinvolte nella presentazione dell'antigene, come le DM, restano nelle vescicole e non vengono espresse sulla membrana. Il meccanismo di questo traffico selettivo è sconosciuto.

Cross-presentazione

Alcune DC sono dotate della particolare capacità di catturare e ingerire cellule infettate da virus o cellule tumorali e di presentarne gli antigeni ai linfociti T CD8+ naïve (Fig. 6-20). In questo modo, gli antigeni ingeriti vengono trasportati dalle vescicole endocitiche al citosol, da cui i peptidi possono avere accesso alla via di presentazione in classe I. Come già ricordato, la maggior parte delle proteine ingerite non ha accesso alla via di presentazione in classe I. Il passaggio delle proteine dalle vescicole endosomiali al citoplasma costituisce una caratteristica unica delle DC che al tempo stesso possono presentare questi antigeni attraverso la via dell'MHC di classe II ai linfociti T helper CD4^{+}, che spesso sono necessari per indurre una risposta completa dei linfociti CD8^{+} (vedi Cap. 11). Questo processo viene definito **cross-presentazione** o **cross-priming**, per indicare che una determinata cellula (quella dendritica) può presentare antigeni che derivano da un'altra cellula (la cellula infettata dal virus o la cellula tumorale) e innescare, o attivare, linfociti T specifici per questi antigeni. Sebbene nominalmente possa sembrare che il processo della cross-presentazione violi la regola che gli antigeni ingeriti sono presentati in associazione alle molecole MHC di classe

II, in questa situazione gli antigeni ingeriti sono anch'essi degradati nei proteasomi per entrare nella via di presentazione di classe I.

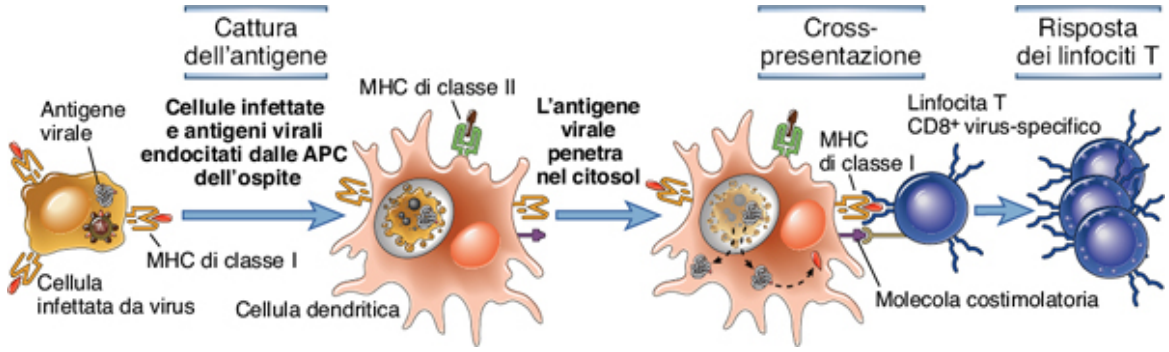


FIGURA 6-20 Cross-presentazione degli antigeni ai linfociti T CD8$^+$. Le cellule infettate dai microbi intracellulari, come i virus, sono ingerite dalle cellule dendritiche e gli antigeni sono trasportati nel citosol, processati e presentati in associazione con le molecole MHC di classe I ai linfociti T CD8$^+$ (vedi anche la Fig. 6-16). Pertanto, le cellule dendritiche sono in grado di presentare antigeni endocitati attraverso la via di processazione in classe I. Si noti che la stessa APC può presentare gli antigeni microbici anche ai linfociti T CD4$^+$ helper in associazione a molecole MHC di classe II.

Nella cross-presentazione è necessaria la fusione fra il RE e i fagosomi che contengono gli antigeni ingeriti. Le proteine ingerite sono poi traslocate al citosol con meccanismi ancora non ben definiti, che sono probabilmente coinvolti nella presentazione delle proteine degradate nel RE. Le proteine che sono state internalizzate nei fagosomi arrivano poi nel compartimento (il citosol) dove normalmente avviene la proteolisi della via di classe I. Le proteine fagocitate subiscono quindi la degradazione nei proteasomi e i peptidi derivati sono nuovamente trasportati da TAP al RE, dove vengono assemblati con molecole MHC di classe I appena sintetizzate, come succede nella via convenzionale di classe I.

Significato fisiologico della presentazione dell'antigene in associazione all'MHC

Abbiamo finora parlato della specificità dei linfociti T CD4$^+$ e CD8$^+$ per gli antigeni proteici presentati su molecole MHC e dei meccanismi con cui si generano i complessi MHC-peptide. In questo paragrafo prenderemo in considerazione l'influenza che la presentazione dell'antigene ha sulle risposte dei linfociti T ad antigeni diversi e sul tipo di antigeni riconosciuti.

Natura delle risposte T

La presentazione di proteine endosomiali o citosoliche rispettivamente da parte della via di classe II o di classe I, determina quale sottopopolazione di linfociti T risponderà agli antigeni presenti nei due compartimenti ed è strettamente legata alle funzioni di queste cellule (Fig. 6-21). Gli antigeni sintetizzati endogenamente, come le proteine virali e tumorali, sono localizzati nel citosol e sono riconosciuti dai CTL $CD8^+$ ristretti per MHC di classe I, che uccideranno le cellule che hanno prodotto gli antigeni intracellulari. Al contrario, gli antigeni extracellulari finiscono spesso nel pool endosomiale e attivano linfociti T $CD4^+$ ristretti per MHC di classe II poiché le proteine delle vescicole sono processate in peptidi che legano l'MHC di classe II. I linfociti T $CD4^+$ funzionano come cellule helper stimolando i linfociti B a produrre anticorpi e i macrofagi ad aumentare la loro funzione fagocitica, entrambi i meccanismi servono a eliminare gli antigeni extracellulari. Gli antigeni di microbi che risiedono in compartimenti diversi stimolano quindi selettivamente le risposte cellulari T più efficaci a eliminare quel particolare tipo di microbo. Questo è molto importante perché il recettore per l'antigene dei linfociti T helper e dei CTL non è in grado di distinguere tra microbi extracellulari e intracellulari. Segregan-do i peptidi sulla base della localizzazione dei microbi, le molecole MHC determinano quale sottopopolazione di linfociti T, $CD4^+$ e $CD8^+$, debba rispondere a un dato patogeno e assicurano la risposta immunitaria più appropriata.

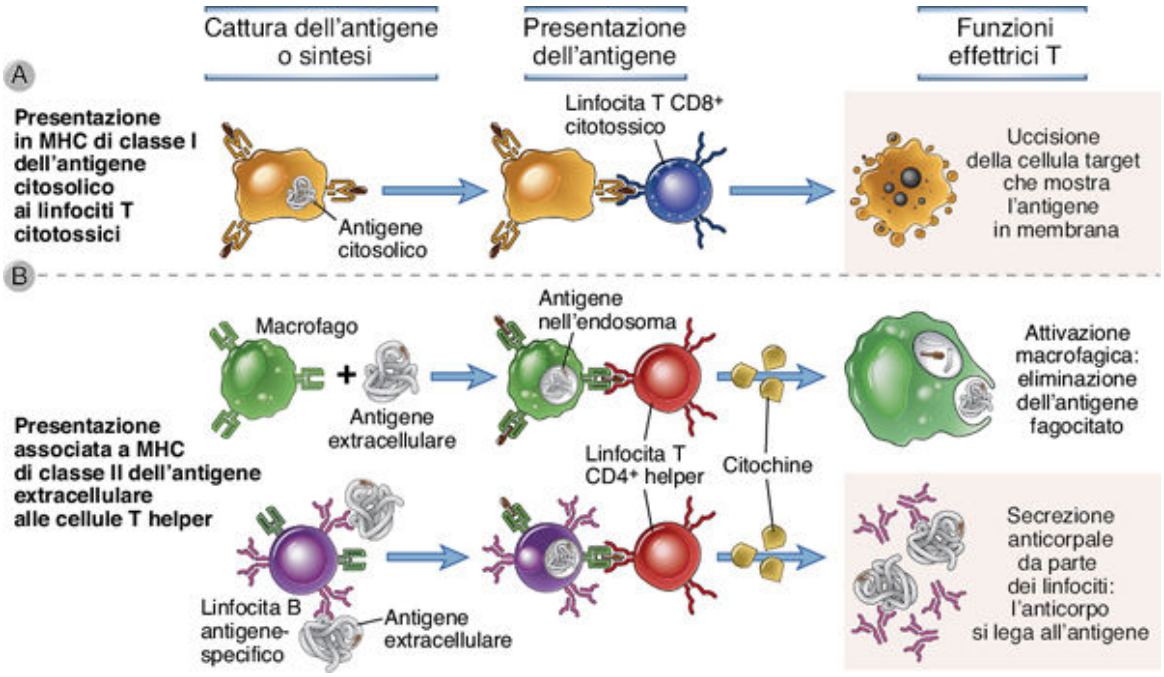


FIGURA 6-21 Presentazione di antigeni extracellulari e citosolici a differenti sottopopolazioni di linfociti T. A. Gli antigeni citosolici sono presentati dalle cellule nucleate ai CTL $CD8^+$, che uccidono (lisano) le cellule che esprimono gli antigeni. **B.** Gli antigeni extracellulari sono presentati dai macrofagi o dai linfociti B ai linfociti T helper $CD4^+$, che eliminano gli antigeni attivando i macrofagi o i linfociti B.

Immunogenicità degli antigeni proteici

Le molecole MHC determinano l'immunogenicità degli antigeni proteici in due modi tra loro correlati.

- ***Gli epitopi delle proteine complesse maggiormente capaci di evocare risposte cellulari T sono spesso quei peptidi che vengono generati per proteolisi nelle APC e che si legano con più avidità alle molecole MHC.*** Se un individuo viene immunizzato con un antigene proteico con molti determinanti antigenici, la maggior parte dei linfociti T responsivi sarà specifica per una o poche sequenze aminoacidiche lineari di quell'antigene. Queste sono dette epitopi **immunodominanti** o determinanti. Le proteasi coinvolte nella processazione dell'antigene generano un'ampia varietà di peptidi ma solo alcuni di questi possiedono le caratteristiche che consentono loro di legarsi alle molecole MHC di ogni individuo (Fig. 6-22). È importante definire la base strutturale dell'immunodominanza, perché questo può permettere un'efficace

manipolazione del sistema immunitario con peptidi sintetici. Un'applicazione di tali conoscenze è la progettazione dei vaccini. Per esempio, una proteina virale potrebbe essere analizzata per la presenza di sequenze aminoacidiche che formino epitopi immunodominanti capaci di legarsi ad alta affinità con le molecole MHC. I peptidi sintetici che contengono tali epitopi possono essere vaccini molto efficaci per evocare una risposta T verso il peptide virale espresso dalle cellule infettate.

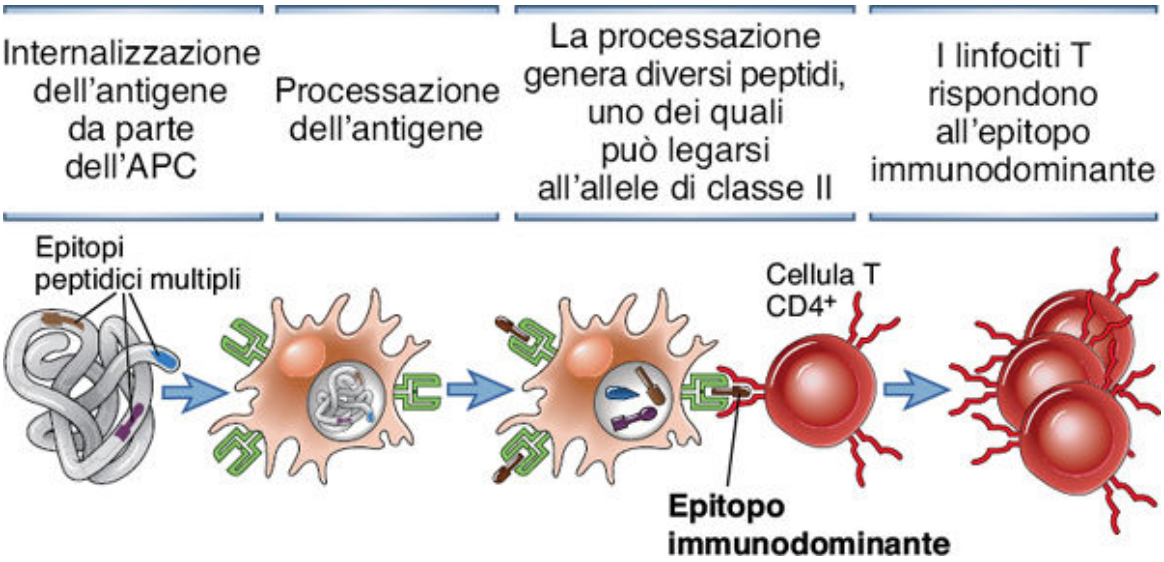


FIGURA 6-22 Immunodominanza dei peptidi. Gli antigeni proteici sono processati per generare peptidi multipli; i peptidi immunodominanti sono quelli che si legano meglio alle molecole MHC di classe I e II disponibili. L'illustrazione evidenzia un antigene extracellulare che genera un peptide che lega molecole MHC di classe II, ma questo si applica anche ai peptidi antigenici citosolici che sono presentati da molecole MHC di classe I.

- ***L'espressione di particolari alleli MHC di classe II in un individuo determina la possibilità di questo individuo di rispondere a un determinato antigene***. Come discusso in precedenza, i geni che controllano la risposta immunitaria (geni *Ir*) sono i geni MHC di classe II. Essi influenzano la responsività immune in quanto le diverse forme alleliche delle molecole MHC II differiscono nella loro capacità di legare i differenti antigeni peptidici e quindi di stimolare i linfociti T helper specifici. Le conseguenze dell'aver ereditato un certo allele MHC dipendono dalla capacità dei peptidi di un certo antigene di legare le molecole MHC codificate da tale allele. Per esempio, se l'antigene è un peptide proveniente da un polline di ambrosia, l'individuo che esprime le molecole MHC di classe II capaci di legare tale peptide è geneticamente

predisposto a sviluppare allergie nei confronti del polline. Di conseguenza, alcuni individui non rispondono ai vaccini (come il vaccino per gli antigeni superficiali dell'epatite B), presumibilmente poiché le loro molecole HLA non sono in grado di legare e presentare i peptidi principali dell'antigene.

PRESENTAZIONE DEGLI ANTIGENI NON PROTEICI A SOTTOPOPOLAZIONI DI LINFOCITI T

Alcune rare popolazioni di linfociti T sono in grado di riconoscere antigeni non proteici in assenza del coinvolgimento di molecole MHC di classe I o II. Queste cellule costituiscono un'eccezione alla regola che sancisce che i linfociti T possano riconoscere solo peptidi associati a molecole MHC. La popolazione meglio definita di queste cellule è quella delle cellule NKT e dei linfociti T γδ.

Le cellule NKT esprimono i marcatori tipici delle cellule natural killer (NK) e dei linfociti T ed esprimono i recettori αβ dei linfociti T, anche se dotati di limitata diversificazione (vedi Cap. 10). Le cellule NKT riconoscono i lipidi e i glicolipidi espressi da molecole MHC non-classiche, come le molecole CD1 che assomigliano all'MHC di classe I. Ci sono diverse proteine CD1 espresse nell'uomo e nel topo. La loro compartimentalizzazione intracellulare differisce parzialmente nelle due specie, tuttavia tutte le molecole CD1 legano e presentano i lipidi attraverso un unico meccanismo. Le molecole CD1 appena sintetizzate legano i lipidi e li portano sulla superficie cellulare. Da qui i complessi CD1-lipide sono endocitati negli endosomi o nei lisosomi, dove i lipidi che sono stati ingeriti dall'ambiente esterno sono catturati e i nuovi complessi CD1-lipidi ritornano sulla superficie cellulare. Così le molecole CD1 durante il ricircolo prendono gli antigeni lipidici endocitati e li presentano, apparentemente senza processarli. Le cellule NKT che riconoscono gli antigeni lipidici possono avere un ruolo nella difesa contro i microbi, soprattutto contro i micobatteri (che sono ricchi di componenti lipidiche).

I linfociti T γδ sono una popolazione T poco numerosa che esprime recettori per l'antigene simili ma non identici a quelli dei linfociti T CD4+ e

CD8+ (vedi Cap. 10). I linfociti T γδ riconoscono molti tipi di antigeni, incluse alcune proteine e lipidi, molecole fosforilate e alchilamine. Questi antigeni non sono presentati su molecole MHC pur non essendo queste cellule ristrette per MHC. Non si sa se sia necessario un tipo particolare di cellula o un sistema particolare di presentazione dell'antigene per la presentazione degli antigeni a queste cellule.

RIEPILOGO

* La maggior parte dei linfociti T riconosce gli antigeni solo sotto forma di peptidi presentati dai prodotti dei geni MHC autologhi (self) sulla superficie delle APC. I linfociti T helper $CD4^+$ riconoscono gli antigeni in associazione con molecole MHC di classe II (riconoscimento ristretto per classe II), mentre i CTL $CD8^+$ riconoscono gli antigeni in associazione con molecole MHC di classe I (riconoscimento ristretto per classe I).
* Le APC specializzate, come le DC, i macrofagi e i linfociti B, catturano gli antigeni proteici extracellulari, li internalizzano e li processano, esponendo i peptidi associati all'MHC di classe II ai linfociti T $CD4^+$. Le DC sono le più efficienti APC per iniziare le risposte primarie poiché attivano i linfociti T naïve. I macrofagi presentano gli antigeni ai linfociti T helper differenziati durante la fase effettrice dell'immunità cellulare, mentre i linfociti B presentano gli antigeni ai linfociti T helper differenziati nel corso delle risposte umorali. Tutte le cellule nucleate possono presentare ai linfociti T $CD8^+$ i peptidi associati alla classe I, derivati da proteine citosoliche, come gli antigeni virali e tumorali.
* L'MHC è una vasta regione del DNA che codifica per molecole MHC di classe I e II altamente polimorfe ed espresse in modo codominante.
* Le molecole MHC di classe I sono composte da una catena α (o pesante) associata in modo non covalente con un polipeptide chiamato β_2-microglobulina. Le molecole di classe II contengono due catene polimorfe codificate nell'MHC, una catena α e una catena β. Entrambe le classi delle molecole MHC sono strutturalmente simili e consistono in una tasca extracellulare capace di legare i peptidi, una regione non polimorfa di tipo Ig, una regione transmembrana e una regione citoplasmatica. La tasca delle molecole MHC che lega i peptidi è formata da α-eliche laterali e da un pavimento costituito da un foglietto β a 8 nastri antiparalleli. I domini a tipo Ig delle molecole MHC di classe I e II contengono i siti di legame per i corecettori CD8 e CD4 dei linfociti T, rispettivamente. I residui polimorfi delle molecole MHC sono localizzati nel dominio che lega il peptide.
* La funzione delle molecole MHC di classe I e II è legare gli antigeni peptidici e presentarli ai linfociti T specifici. I peptidi associati alle molecole MHC di classe I sono riconosciuti dalle cellule T $CD8^+$, mentre i peptidi associati alle molecole MHC di classe II sono riconosciuti dai linfociti $CD4^+$, che sono prevalentemente costituiti da cellule con funzione helper. Le molecole MHC legano solo un peptide alla volta e tutti i peptidi che si legano a una particolare molecola MHC condividono caratteristiche strutturali comuni. Ciascuna molecola MHC ha una certa promiscuità per i peptidi e può legare molteplici peptidi che condividono caratteristiche strutturali comuni, quali i residui àncora.
* La tasca che lega i peptidi delle molecole MHC di classe I può accogliere peptidi di 6-16 residui aminoacidici, mentre quella delle molecole MHC di classe II permette il legame a

peptidi più grandi (fino a 30 o più residui aminoacidici). I residui polimorfi delle molecole MHC sono localizzati a livello del dominio che lega i peptidi. Alcuni dei residui polimorfi determinano la specificità di legame per i peptidi formando strutture (nicchie) che interagiscono con i residui complementari del peptide legato, chiamati residui àncora. Altri residui polimorfi dell'MHC e alcuni residui del peptide non sono coinvolti nel legame alle molecole MHC, ma al contrario formano strutture riconosciute dai linfociti T.

* Le molecole MHC di classe I sono espresse su tutte le cellule nucleate, mentre le molecole MHC di classe II sono espresse soprattutto sulle cellule specializzate nella presentazione dell'antigene, come le DC, i macrofagi, i linfociti B e pochi altri tipi cellulari, comprese le cellule endoteliali e le cellule epiteliali timiche. L'espressione dei prodotti genici dell'MHC è aumentata da stimoli infiammatori e immunitari, in particolare da citochine come l'IFN-γ, che stimolano la trascrizione dei geni MHC.
* La processazione dell'antigene consiste nella conversione di proteine native in peptidi associati a molecole MHC. Questo processo presuppone l'introduzione di antigeni proteici esogeni nelle APC o la sintesi di antigeni nel citoplasma, la degradazione proteolitica di queste proteine in peptidi, il legame dei peptidi alle molecole MHC e l'esposizione dei complessi peptide-MHC sulla superficie delle APC per il riconoscimento da parte dei linfociti T. Così le proteine extracellulari e quelle intracellulari sono campionate dalle vie di processazione dell'antigene e i peptidi che derivano sia da proteine normali self sia da proteine eterologhe sono esposti dalle molecole MHC per il riconoscimento da parte dei linfociti T.
* Per la via di processazione in classe I, le proteine citosoliche sono degradate proteoliticamente dal proteasoma, generando peptidi che legano le molecole MHC di classe I. Questi peptidi sono trasferiti dal citosol al RE grazie all'intervento di un trasportatore ATP-dipendente chiamato TAP. I dimeri neosintetizzati di classe I/β_2-microglobulina vengono legati al complesso TAP e ricevono peptidi trasportati nel RE. I complessi stabili MHC-peptide fuoriescono dal RE attraverso il complesso di Golgi, diretti alla superficie cellulare.
* Per la via di processazione in classe II, le proteine extracellulari sono internalizzate negli endosomi, dove sono digerite da enzimi che funzionano a pH acido. Le molecole MHC di classe II neosintetizzate associate con la catena Ii sono trasportate dal RE nelle vescicole endosomiali. Qui la catena Ii è tagliata proteoliticamente e il piccolo peptide che rimane, denominato CLIP, viene rimosso dalla tasca dell'MHC dalla molecola HLA-DM. I peptidi generati dalle proteine extracellulari quindi possono legarsi alla tasca delle molecole MHC di classe II e il complesso trimerico (catene α e β dell'MHC di classe II e peptide) può essere esposto sulla superficie della cellula.
* Queste vie per la presentazione dell'antigene MHC-ristretta garantiscono che la maggior parte delle cellule dell'organismo sia ispezionata per la possibile presenza di antigeni non-self. Questo processo inoltre assicura che anche le proteine derivanti da microbi extracellulari generino preferenzialmente peptidi che si legano a molecole MHC di classe II per il riconoscimento da parte dei linfociti T helper $CD4^+$, che attivano meccanismi effettori che eliminano gli antigeni extracellulari. Al contrario, proteine sintetizzate da microbi intracellulari (citosoliche) generano peptidi che vanno a legarsi alle molecole MHC di classe I per il riconoscimento da parte dei CTL $CD8^+$, la cui funzione è di eradicare cellule che contengono un agente infettivo. L'immunogenicità degli antigeni proteici estranei dipende dalla capacità delle vie di processazione dell'antigene di generare peptidi in grado di legarsi a molecole MHC.

LETTURE CONSIGLIATE

Ruolo delle cellule dendritiche nella cattura e nella presentazione dell'antigene

Bousso P: T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies. *Nature Reviews Immunology* 8:675–684 (2008).

Collin M.; McGovern N.; Haniffa M: Human dendritic cell subsets. *Immunology* 140:22–30 (2013).

Heath W.R.; Carbone F.R: Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nature Immunology* 10:1237–1244 (2009).

Merad M.; Sathe P.; Helft J.; Miller J.; Mortha A: The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and inflamed setting. *Annual Review of Immunology* 31:563–604 (2013).

Mildner A.; Jung S: Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* 40:642–656 (2014).

Satpathy A.T.; Wu X.; Albring J.C.; Murphy K.M: Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nature Immunology* 13:1145–1154 (2012).

Shortman K.; Sathe P.; Vremec D.; Naik S.; O'Keeffe M: Plasmacytoid dendritic cell development. *Advances in Immunology* 120:105–126 (2013).

Teijeira A.; Russo E.; Halin C: Taking the lymphatic route: dendritic cell migration to draining lymph nodes. *Seminars in Immunopathology* 36:261–274 (2014).

Struttura dei geni MHC, delle molecole MHC e del complesso peptide-molecole MHC

Bjorkman P.J.; Saper M.A.; Samraoui B.; Bennett W.S.; Strominger J.L.; Wiley D.C: Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. *Nature* 329:506–512 (1987).

Horton R.; Wilming L.; Rand V.; et al.: Gene map of the extended human MHC. *Nature Reviews Genetics* 5:889–899 (2004).

Marrack P.; Scott-Browne J.P.; Dai S.; Gapin L.; Kappler J.W: Evolutionarily conserved amino acids that control TCR-MHC interaction. *Annual Review of Immunology* 26:171–203 (2008).

Martinez-Borra J.; Lopez-Larrea C: The emergence of the major histocompatibility complex. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 738:277–289 (2012).

Mazza C.; Malissen B: What guides MHC-restricted TCR recognition? *Seminars in Immunology* 19:225–235 (2007).

Reith W.; Leibundgut-Landmann S.; Waldburger J.M: Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nature Reviews Immunology* 5:793–806 (2005).

Processazione degli antigeni proteici e presentazione su MHC dei peptidi

Akram A.; Inman R.D: Immunodominance: a pivotal principle in host response to viral infections. *Clinical Immunology* 143:99–115 (2012).

Basler M.; Kirk C.J.; Groettrup M: The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Current Opinion in Immunology* 25 74–80 (2013).

Blum J.S.; Wearsch P.A.; Cresswell P: Pathways of antigen processing. Annual Review of Immunology 31:443–473 (2013).

Chapman H.A: Endosomal proteases in antigen presentation. *Current Opinion in Immunology* 18 78–84 (2006).

Hansen T.H.; Bouvier M: MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. *Nature Reviews Immunology* 9:503–513 (2009).
Neefjes J.; Jongsma M.L.; Paul P.; Bakke O: Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology* 11:823–836 (2011).
Purcell A.W.; Elliott T: Molecular machinations of the MHC-I peptide loading complex. *Current Opinion in Immunology* 20:75–81 (2008).
Schulze M.S.; Wucherpfennig K.W: The mechanism of HLA-DM induced peptide exchange in the MHC class II antigen presentation pathway. *Current Opinion in Immunology* 24:105–111 (2012).
Stern L.J.; Potolicchio I.; Santambrogio L: MHC class II compartment subtypes: structure and function. *Current Opinion in Immunology* 18:64–69 (2006).
Trombetta E.S.; Mellman I: Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annual Review of Immunology* 23:975–1028 (2005).
Vyas J.M.; Van der Veen A.G.; Ploegh H.L: The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nature Reviews Immunology* 8:607–618 (2008).
Watts C: The endosome-lysosome pathway and information generation in the immune system. *Biochim Biophys Acta* 14-21:2012 (1824).

Cross-presentazione

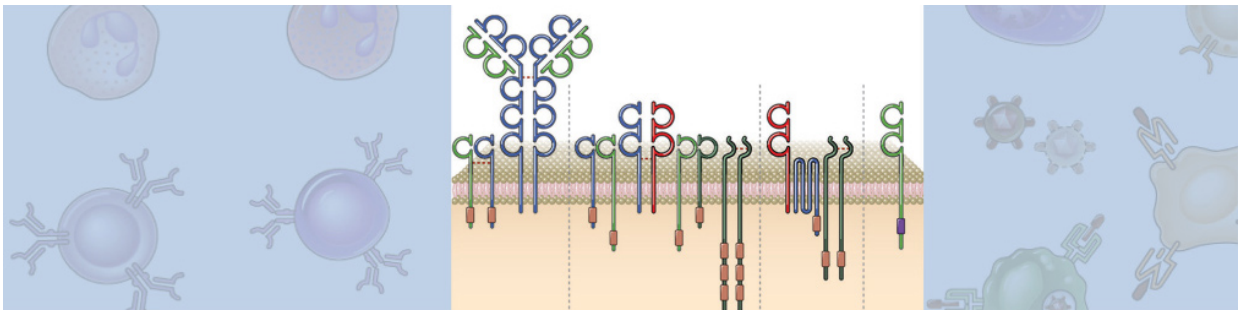
Joffre O.P.; Segura E.; Savina A.; Amigorena S: Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology* 12:557–569 (2012).
Kurts C.; Robinson B.W.; Knolle P.A: Cross-priming in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 10:403–414 (2010).
Lin M.L.; Zhan Y.; Villadangos J.A.; Lew A.M: The cell biology of cross-presentation and the role of dendritic cell subsets. *Immunology and Cell Biology* 86:353–362 (2008).

Presentazione degli antigeni “non classica”

Adams E.J.; Luoma A.M: The adaptable major histocompatibility complex (MHC) fold: structure and function of nonclassical and MHC class I-like molecules. *Annual Review of Immunology* 31:529–561 (2013).
Cohen N.R.; Garg S.; Brenner M.B: Antigen presentation by CD1: lipids, T cells, and NKT cells in microbial immunity. *Advances in Immunology* 102:1–94 (2009).

CAPITOLO

7



Recettori e vie di trasduzione del sistema immunitario

CARATTERISTICHE GENERALI DELLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE

Proteine che trasducono il segnale e proteine adattatrici

FAMIGLIA DEI RECETTORI DEL SISTEMA IMMUNITARIO

Caratteristiche generali della trasduzione del segnale del recettore per l'antigene

COMPLESSO RECETTORIALE DEI LINFOCITI T

Struttura del complesso recettoriale dei linfociti T

Trasduzione del segnale da parte del complesso recettoriale dei linfociti T

Ruolo dei corecettori CD4 e CD8 nell'attivazione dei linfociti T

Ruolo delle tirosine chinasi e di una chinasi lipidica nell'attivazione dei linfociti T

Reclutamento e modificazione delle proteine adattatrici

Formazione della sinapsi immunologica

MAP chinasi nella trasduzione del segnale dei linfociti T

Calcio e proteina chinasi C nella trasduzione del segnale dei linfociti T

Attivazione dei fattori di trascrizione che regolano l'espressione genica nei linfociti T

Modulazione della trasduzione del segnale dei linfociti T da parte di tirosine fosfatasi

Trasduzione del segnale dei recettori costimolatori dei linfociti T

Alterazioni metaboliche durante l'attivazione dei linfociti T

COMPLESSO RECETTORIALE DEI LINFOCITI B

Struttura del recettore per l'antigene dei linfociti B

Trasduzione del segnale da parte del recettore per l'antigene dei linfociti B

Il recettore per il complemento CR2/CD21 funziona da corecettore per i linfociti B

Vie di trasduzione del segnale a valle del recettore per l'antigene dei linfociti B

ATTENUAZIONE DELLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE DEI RECETTORI DEL SISTEMA IMMUNITARIO

Recettori inibitori delle cellule NK e dei linfociti B e T

Ruolo delle ubiquitina ligasi E3 nella degradazione delle proteine della trasduzione del segnale

RECETTORI PER LE CITOCHINE E TRASDUZIONE DEL SEGNALE

Classi di recettori per le citochine

Trasduzione del segnale tramite JAK e STAT

Vie di attivazione di NF-κB

RIEPILOGO

L’idea che le cellule potessero esprimere recettori di membrana in grado di rispondere a segnali extracellulari fu concepita nel 1897 da Paul Ehrlich, uno dei padri fondatori dell’immunologia moderna, quando, nella sua “teoria della catena laterale”, ipotizzò che gli anticorpi di membrana potessero riconoscere e stimolare il rilascio di altri anticorpi verso un antigene. I recettori per gli ormoni furono tuttavia scoperti solo molti decenni più tardi, nella seconda metà del XX secolo, e fu necessario attendere fino all’inizio degli anni Ottanta per giungere all’identificazione del recettore per l’antigene dei linfociti.

I recettori di membrana svolgono due funzioni principali: la trasduzione del segnale e l’adesione fra cellule o alla matrice extracellulare. Il termine **trasduzione del segnale** indica l’insieme delle vie biochimiche intracellulari attivate all’interno della cellula in seguito al legame dei ligandi con i recettori specifici. La cascata di trasduzione del segnale attivata dai recettori inizia generalmente con una **fase citosolica**, nella quale la porzione citoplasmatica del recettore stesso o delle proteine a esso associate viene modificata post-traduzionalmente, permettendo così l’attivazione o la traslocazione nucleare dei fattori trascrizionali. A questa segue la **fase nucleare**, nella quale i fattori trascrizionali modulano la trascrizione dei geni bersaglio (Fig. 7-1). Alcune vie di trasduzione del segnale stimolano la motilità cellulare o attivano l’esocitosi dei granuli citoplasmatici, senza variazioni dell’espressione genica. La trasduzione del segnale può avere diversi effetti sulla cellula, i quali spaziano dall’acquisizione di nuove funzioni alla differenziazione, alla protezione dalla morte cellulare, alla proliferazione e crescita, fino all’arresto del ciclo cellulare e alla morte per apoptosi.

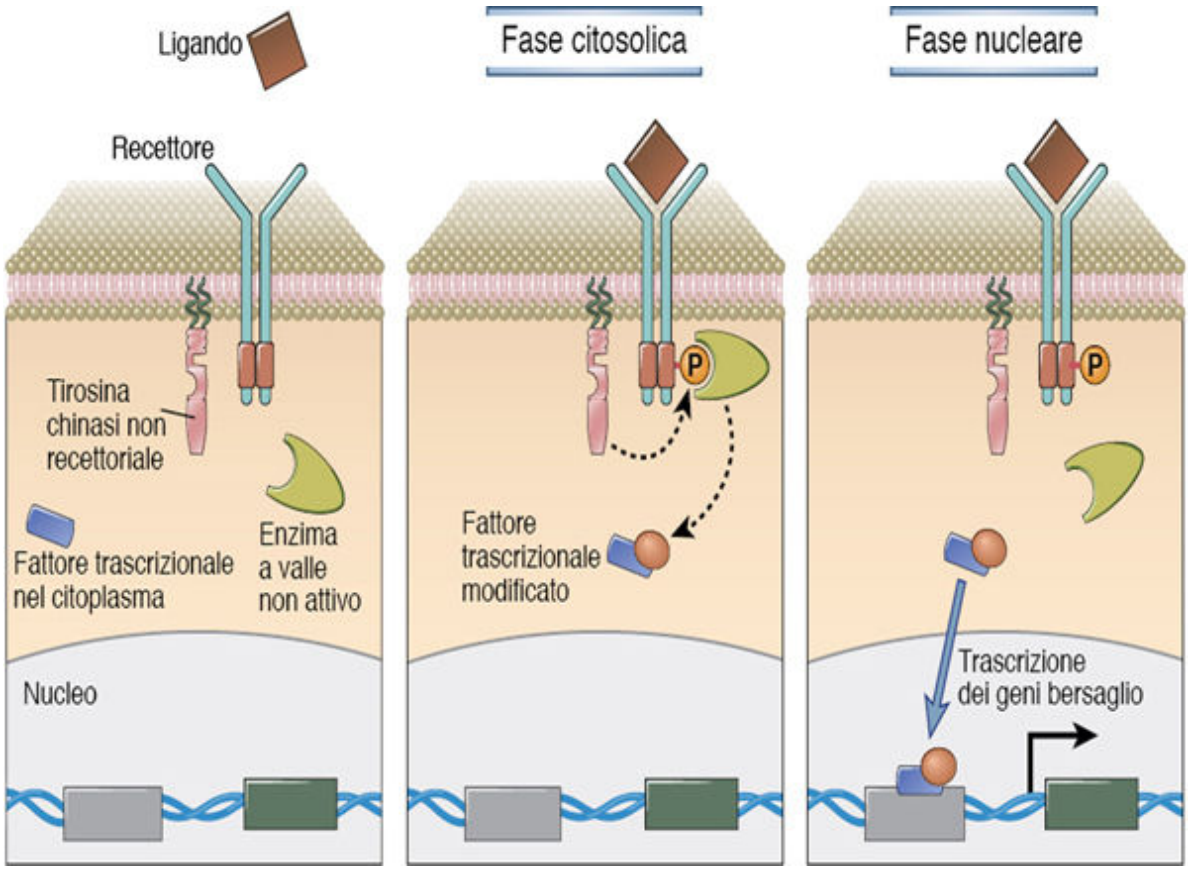


FIGURA 7-1 La trasduzione del segnale da parte dei recettori di membrana si compone di una fase citosolica e di una nucleare. La figura mostra un generico recettore che, in seguito al riconoscimento del ligando, attiva una tirosina chinasi non recettoriale. Durante la fase citosolica, la chinasi non recettoriale fosforila un residuo di tirosina nella coda citoplasmatica del recettore, la quale acquisisce la capacità di reclutare e attivare un enzima a valle. Una volta attivato, questo enzima modifica post-traduzionalmente uno specifico fattore trascrizionale, localizzato nel citoplasma. In questo esempio semplificato, la fase citosolica presenta un solo evento enzimatico, ma molte vie di trasduzione prevedono l'attivazione di eventi enzimatici multipli. Durante la fase nucleare, il fattore trascrizionale così modificato entra nel nucleo e induce l'espressione di geni bersaglio che possiedono un sito di legame nel proprio promotore o in altre regioni regolatrici.

I recettori per l'antigene dei linfociti B e T si collocano tra le più sofisticate macchine di trasduzione del segnalazione conosciute e costituiranno l'oggetto di un'ampia parte di questo capitolo. Dapprima forniremo una panoramica dei meccanismi coinvolti nella trasduzione del segnale. Successivamente, ci concentreremo sulla cascata attivata dai recettori che sono distribuiti clonalmente nei linfociti e da quelli, strutturalmente correlati, espressi dalle cellule dell'immunità innata. Nel corso della trattazione del recettore per l'antigene esamineremo anche il ruolo di altri recettori chiamati corecettori e delle molecole costimolatorie,

che potenziano i segnali di attivazione generati dal recettore per l'antigene nei linfociti, e discuteremo la funzione dei recettori inibitori nei linfociti T, B e nelle cellule NK. Prenderemo anche in considerazione diverse classi di recettori per le citochine. Infine, per illustrare le fasi di attivazione di un fattore di trascrizione prototipico, esamineremo le vie principali che portano all'attivazione del fattore nucleare κB (*Nuclear Factor κB*, NF-κB), un fattore di trascrizione fondamentale sia per la risposta innata sia per quella adattativa.

CARATTERISTICHE GENERALI DELLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE

La trasduzione del segnale viene generalmente iniziata da recettori costituiti da proteine integrali di membrana i cui domini extracellulari riconoscono ligandi solubili oppure adesi alle cellule circostanti. Un'altra categoria di recettori, i recettori nucleari, è costituita da fattori trascrizionali intracellulari, che vengono attivati da ligandi liposolubili che possono oltrepassare la membrana citoplasmatica.

Per innescare la cascata di trasduzione del segnale è generalmente necessario che i ligandi inducano l'aggregazione delle proteine recettoriali (o cross-linking) oppure la modificazione conformazionale del recettore stesso, entrambe le situazioni sono attivate dal riconoscimento dal ligando. Questi due eventi permettono una modificazione della forma geometrica della porzione intracitoplasmatica del recettore, la quale a sua volta promuove l'interazione con le molecole responsabili della trasduzione del segnale.

Un evento iniziale comune che si verifica durante la trasduzione del segnale è l'aggiunta, a opera di un enzima, di un gruppo fosfato sulla catena laterale di residui di tirosina, serina o treonina presenti nella porzione citosolica di un recettore o di una proteina adattatrice. Gli enzimi responsabili di questa azione sono chiamati **proteine chinasi**. Nei linfociti, la maggior parte degli eventi precoci dipendono da proteine chinasi che fosforilano residui di tirosina e sono perciò dette **proteine tirosine chinasi**. Altre proteine chinasi coinvolte sono le serine/treonine chinasi, le quali

fosforilano residui di serina o treonina. Alcuni enzimi fosforilano substrati lipidici e sono perciò detti **chinasi lipidiche**. Per ciascun tipo di fosforilazione esiste anche una specifica fosfatasi, cioè un enzima che rimuove i gruppi fosfato e può in questo modo modulare la trasduzione del segnale. Infatti, le fosfatasi svolgono ruoli importanti e normalmente di tipo inibitorio.

Oltre alla fosforilazione, molte altre modifiche post-traduzionali possono regolare la trasduzione del segnale. Un'altra modificazione, che descriveremo più avanti, è l'aggiunta di molecole di ubiquitina. In genere, essa contrassegna le proteine destinate alla degradazione, ma in molti tipi cellulari (per esempio nei linfociti) regola anche la trasduzione del segnale. Infine, non va dimenticata l'aggiunta di lipidi: essa permette alle proteine di localizzarsi nella membrana o addirittura in specifiche regioni della membrana e di interagire efficacemente con altre molecole di trasduzione anch'esse direzionate al medesimo microdominio di membrana. Alcuni fattori di trascrizione subiscono modificazioni funzionali mediante acetilazione e le code *N*-terminali degli istoni possono essere acetilate e metilate per modulare l'espressione genica, la replicazione del DNA e la ricombinazione del DNA.

I recettori sono raggruppati nelle seguenti categorie, basate sul tipo di meccanismo di trasduzione del segnale e sulle vie biochimiche che essi utilizzano (Fig. 7-2).

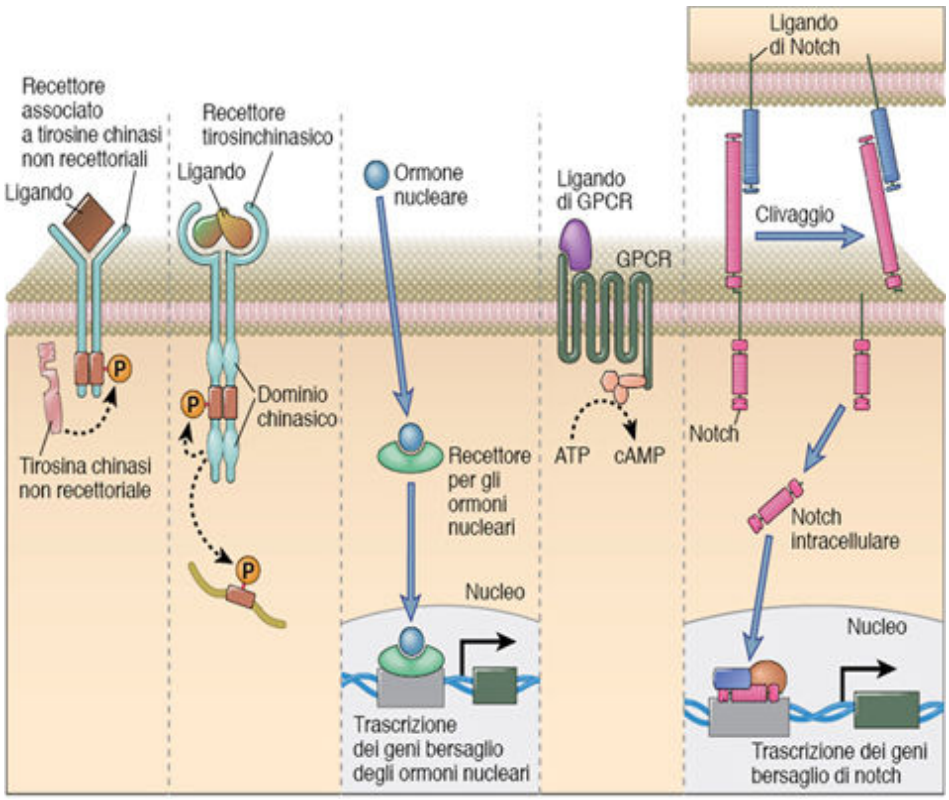


FIGURA 7-2 Principali categorie di recettori del sistema immunitario. La figura mostra un recettore che utilizza una tirosina chinasi non recettoriale, un recettore tirosinchinasico, un recettore nucleare che riconosce il proprio ligando e attiva la trascrizione genica, un recettore a sette domini transmembrana accoppiato a una proteina G (GPCR) e infine il recettore Notch il quale, dopo aver riconosciuto un ligando espresso su una cellula differente, viene tagliato causando la formazione di un frammento intracellulare che trasloca al nucleo e attiva la trascrizione di specifici geni bersaglio.

- Recettori che utilizzano **tirosine chinasi non recettoriali**. Le code citoplasmatiche di questa categoria di recettori di membrana non possiedono attività enzimatica intrinseca. L'attivazione del recettore dipende quindi da una tirosina chinasi distinta, detta *tirosina chinasi non recettoriale*, la quale si occupa di fosforilare specifici residui del recettore stesso o di altre proteine associate al recettore (vedi Fig. 7-1). Esempi di recettori appartenenti a questa categoria sono i recettori del sistema immunitario (alcuni dei quali riconoscono l'antigene mentre altri riconoscono le porzioni Fc degli anticorpi) e alcuni recettori per le citochine e le integrine (molecole di adesione cruciali per la risposta immunitaria). Oltre ai recettori del sistema immunitario, anche alcuni recettori per le citochine, di cui si parlerà più avanti, usano recettori che utilizzano tirosine chinasi non recettoriali. Anche le integrine, recettori

con funzioni cruciali nell'adesione cellulare, utilizzano recettori che usano tirosine chinasi non recettoriali.

- I **recettori tirosinchinasici (*Receptor Tyrosine Kinases*, RTK)** sono proteine integrali di membrana che, in seguito all'aggregazione indotta da ligandi multivalenti, attivano uno o più domini tirosinchinasici presenti nelle code citoplasmatiche. Il recettore c-Kit, fondamentale per l'ematopoiesi e la linfopoiesi, rappresenta un esempio di recettore tirosinchinasico. Altri esempi sono il recettore per l'insulina, il recettore per il fattore di crescita epidermico (*Epidermal Growth Factor*, EGF) e il recettore per il fattore di crescita derivato dalle piastrine (*Platelet-Derived Growth Factor*, PDGF).
- **Recettori nucleari.** Questi recettori si trovano abitualmente nel nucleo o vi migrano per fungere da fattori di trascrizione. L'associazione di un ligando liposolubile con il proprio recettore nucleare permette a quest'ultimo di indurre o reprimere la trascrizione genica. I recettori nucleari per gli ormoni, come per esempio il recettore per la vitamina D e il recettore per i glucocorticoidi, possono influenzare eventi che spaziano dallo sviluppo del sistema immunitario alla modulazione dell'espressione di citochine.
- **I recettori accoppiati alle proteine G (*G Protein-Coupled Receptors*, GPCR)** sono recettori che agiscono attivando le proteine che legano il GTP (proteine G) a loro associate. Sono polipeptidi che attraversano sette volte la membrana citoplasmatica, ragion per cui sono talvolta chiamati recettori serpentinici. Nel caso di questi recettori, il riconoscimento del ligando provoca un cambiamento conformazionale che attiva una proteina G eterotrimerica, scambiando il GDP legato con il GTP. Una volta attivata, la proteina G dà inizio a tutte le successive vie di trasduzione. Esempi di questa categoria sono i recettori per i leucotrieni, le prostaglandine, l'istamina, i frammenti del complemento C3a e C5a, i peptidi formilati batterici e le chemochine (vedi Cap. 3). Le diverse proteine G che si possono associare ai vari GPCR possono attivare o inibire varie vie effettrici. I due principali enzimi attivati dai GPCR sono l'adenilato ciclasi, che converte l'ATP in cAMP, e la fosfolipasi C, di cui discuteremo più avanti.
- **Altre classi recettoriali.** Altri recettori, noti finora per il loro ruolo nello sviluppo embrionale o per la loro presenza in particolari tessuti,

stanno rivelando la loro importanza anche nelle risposte immunitarie. Per esempio, le proteine appartenenti alla famiglia **Notch**, coinvolte nello sviluppo di molte specie, sono fondamentali anche per determinare il destino dei linfociti in via di sviluppo (vedi Cap. 8) e influenzano probabilmente anche l'attivazione di quelli maturi. L'associazione di specifici ligandi determina il taglio proteolitico dei recettori di questa famiglia e la traslocazione nucleare del loro dominio citoplasmatico (Notch intracellulare), che entra a fare parte di un complesso trascrizionale. Un gruppo di ligandi, detti proteine **Wnt**, attiva recettori transmembrana che modulano i livelli di β-catenina, la quale facilita l'attività trascrizionale di proteine fondamentali per lo sviluppo dei linfociti B e T, come verrà discusso nel Capitolo 8. Molti altri recettori e vie di trasduzione, originariamente scoperti in cellule che non appartengono al sistema immunitario, cominciano a essere studiati nel contesto della biologia dei linfociti. In questo capitolo non affronteremo in modo esaustivo tutte le vie di trasduzione del segnale.

Proteine che trasducono il segnale e proteine adattatrici

Le molecole coinvolte nella trasduzione del segnale sono spesso composte da moduli, ciascuno con una specifica funzione di legame o dotato di attività catalitica. La scoperta della fosforilazione in tirosina è stata una pietra miliare nello studio delle vie di trasmissione del segnale. Successivamente, si scoprì che la sequenza di aminoacidi circostante al residuo di tirosina è importante per consentire l'interazione tra varie molecole (vedi più avanti). Lo studio delle tirosine chinasi non recettoriali ha dimostrato che le molecole di trasduzione contengono moduli, o domini, distinti, ognuno dei quali svolge una funzione differente. L'omologo cellulare della proteina trasformante del virus del sarcoma di Rous, chiamato c-Src, è il prototipo di una famiglia di tirosine chinasi non recettoriali importanti dal punto di vista immunitario dette, appunto, **chinasi della famiglia Src**. La c-Src contiene domini specifici quali **SH2** e **SH3** (***Src Homology 2*** e ***3***). Inoltre contiene un dominio catalitico tirosinchinasico e un dominio *N*-terminale che permette il legame covalente di lipidi (un acido miristico in questo caso). L'acido miristico permette a queste chinasi di localizzarsi in membrana. La struttura modulare di tre famiglie di tirosine

chinasi importanti per il funzionamento del sistema immunitario è riportata nella Figura 7-3.

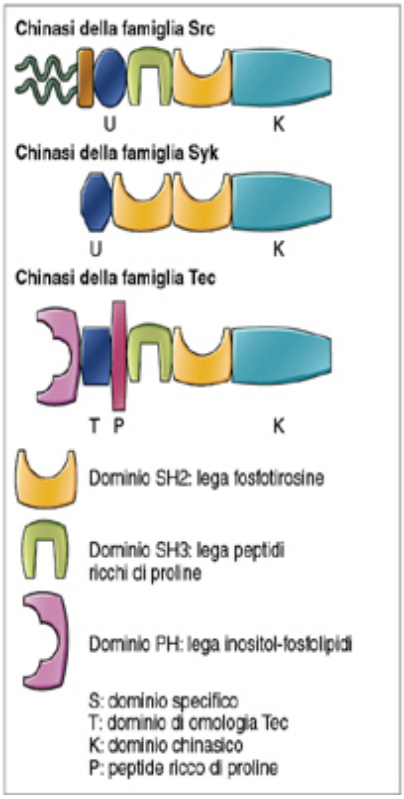


FIGURA 7-3 Struttura modulare delle tirosine chinasi responsabili dell'attivazione linfocitaria. I moduli comprendono: domini SH2 che legano specifici polipeptidi contenenti fosfotirosine, domini SH3 che riconoscono sequenze ricche di prolina, domini PH che riconoscono PIP3 o altri lipidi derivati dal fosfatidilinositolo e i domini di omologia Tec, caratteristici delle tirosine chinasi della famiglia Tec. Le famiglie di tirosine chinasi illustrate nella figura sono: la famiglia Src, comprendente c-Src, Lyn, Fyn e Lck; la famiglia Syk, comprendente Syk e ZAP-70; la famiglia Tec, comprendente Tec, Btk e Itk.

I domini SH2 sono composti da circa 100 aminoacidi ripiegati in una particolare conformazione che legano peptidi di altre proteine contenenti fosfotirosine. Nella trasduzione del segnale del recettore per l'antigene, le chinasi della famiglia Src fosforilano residui di tirosina presenti nelle code citoplasmatiche di proteine che fanno parte del complesso recettoriale (descritto più avanti). Questi motivi di fosfotirosina servono poi da siti di legame per i domini SH2 presenti in tirosine chinasi della famiglia Syk, quali per esempio Syk e ZAP-70 (vedi Fig. 7-3). Il reclutamento di una chinasi della famiglia Syk attraverso un'interazione specifica tra un dominio SH2 e una fosfotirosina è un passaggio chiave nell'attivazione del recettore

per l’antigene. I domini SH3 sono composti da circa 100 aminoacidi e rendono possibili le interazioni proteina-proteina legandosi a sequenze ricche di prolina. Un ulteriore tipo di dominio modulare, chiamato dominio PH (*Pleckstrin Homology*), può riconoscere specifici fosfolipidi. Il dominio PH presente in alcune molecole della trasduzione del segnale, tra cui Btk, una tirosina chinasi appartenente alla famiglia Tec, riconosce il fosfatidilinositolo trifosfato (PIP3), una struttura lipidica situata nel foglietto interno della membrana citoplasmatica.

Le **proteine adattatrici** funzionano come “siti di attracco molecolari”, cioè permettono di unire fisicamente enzimi diversi e promuovono l’assemblaggio di complessi di molecole coinvolte nella trasduzione del segnale. Le proteine adattatrici possono essere integrali di membrana come la proteina LAT (*Linker for the Activation of T cells*) (Fig. 7-4), o citosoliche come le proteine BLNK (*B cell Linkers*), SLP-76 (*SH2 domain-containing Linker Protein of 76 kD*) e GADS (*Grb-2-related Adaptor protein Downstream of Shc*). Una molecola adattatrice prototipica contiene domini specifici che rendono possibili le interazioni proteina-proteina, come per esempio i domini SH2 e SH3 o altri tipi di domini modulari che non abbiamo menzionato. Le proteine adattatrici spesso contengono sequenze ricche di prolina, che possono essere legate dai domini SH3 di altre proteine, e residui di tirosina, che possono essere fosforilati da tirosine chinasi e che servono da siti di attracco per altre molecole di trasduzione. I residui aminoacidici che circondano una tirosina fosforilata determinano quale specifico dominio SH2, e dunque quale proteina, potrà legarsi a quel determinato sito. Per esempio, una tirosina chinasi responsabile dell’attivazione di una via di trasduzione può fosforilare un motivo YxxM (in cui Y rappresenta la tirosina, M rappresenta la metionina e x un aminoacido qualunque) di una proteina adattatrice e questo evento permetterà il legame con un dominio SH2 della chinasi lipidica fosfatidilinositolo 3 (PI3K). Una sequenza ricca di prolina nella stessa proteina adattatrice può legarsi a un dominio SH3 specifico in un’altra tirosina chinasi a valle. Così, la fosforilazione della tirosina dell’adattatore può portare una tirosina chinasi a valle in stretto contatto con la PI3K, che ne risulterà a sua volta fosforilata e attivata. La traduzione del segnale può dunque essere visualizzata come una specie di “social network”. Un segnale iniziale (per esempio una fosforilazione in tirosina) determina l’associazione

di diverse proteine in corrispondenza di “attracchi molecolari” (le proteine adattatrici), portando all’attivazione di enzimi specifici che alla fine influenzano la localizzazione nucleare o l’attività di specifici fattori trascrizionali, oppure inducono altri eventi cellulari (per esempio la polimerizzazione dell’actina).

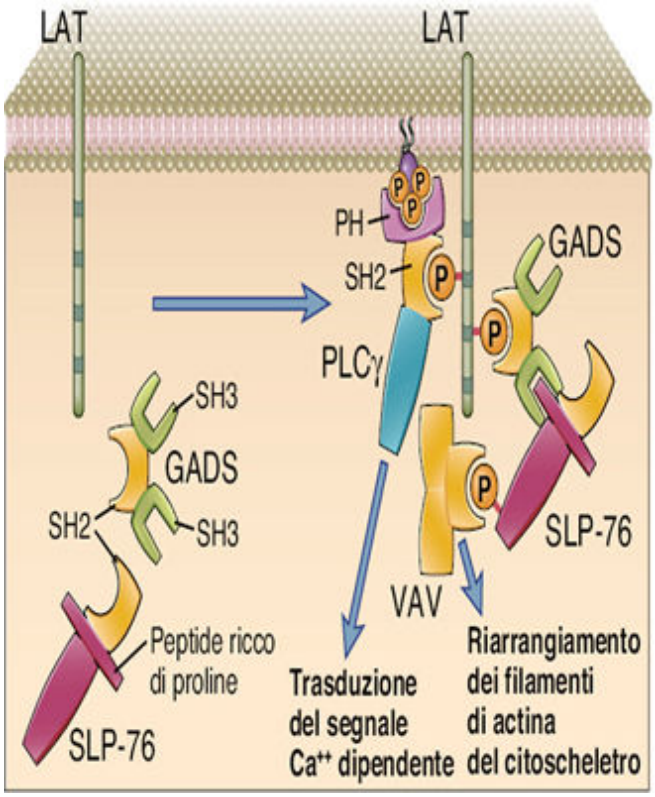


FIGURA 7-4 Esempi di proteine adattatrici che partecipano all’attivazione dei linfociti. *A sinistra* sono mostrati in un linfocita T non attivato LAT, una proteina integrale di membrana che funziona da adattatrice, e GADS e SLP-76, due proteine adattatrici citosoliche. *A destra*, dopo l’attivazione, LAT viene fosforilata in tirosina e recluta PLCγ (che si lega simultaneamente al fosfolipide di membrana PIP3) e la proteina adattatrice GADS, entrambe dotate di domini SH2. La proteina GADS possiede anche un dominio SH3 che lega la SLP-76 in corrispondenza di una sequenza aminoacidica ricca di residui di prolina. La SLP-76 viene a sua volta fosforilata in tirosina e recluta la proteina VAV.

FAMIGLIA DEI RECETTORI DEL SISTEMA IMMUNITARIO

I recettori del sistema immunitario costituiscono una famiglia particolare di complessi recettoriali tipicamente composti da proteine integrali di membrana appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline (Ig) che sono responsabili del riconoscimento del ligando e sono associate con altre proteine transmembrana, responsabili della trasduzione del segnale, dotate di code citoplasmatiche contenenti specifici motivi di tirosina. Esistono tuttavia delle eccezioni rappresentate da recettori composti da una singola catena il cui dominio extracellulare riconosce il ligando, mentre la coda citoplasmatica contiene residui di tirosina che trasducono il segnale. Le proteine che trasducono il segnale si trovano frequentemente in stretto contatto con tirosine chinasi non recettoriali della famiglia Src, ancorate al foglietto interno della membrana citoplasmatica mediante code lipidiche *N*-terminali.

Come già accennato, esse presentano motivi citoplasmatici contenenti tirosina che sono generalmente di due tipi: i domini ITAM e i domini ITIM. I **domini ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motifs*)** sono presenti in recettori coinvolti nell'attivazione cellulare e sono caratterizzati dalla sequenza YxxL/I$(x)_{6-8}$YxxL/I, dove *Y* rappresenta un residuo di tirosina, *L* di leucina, *I* di isoleucina e *X* un aminoacido qualunque. Quando il recettore viene attivato, entrambe le tirosine possono essere fosforilate da chinasi della famiglia Src. Entrambi i residui di tirosina ITAM possono reclutare membri della famiglia Syk/ZAP-70, che contengono due domini SH2 in tandem, ciascuno dei quali lega uno dei due motivi YxxL/I fosforilati. Il legame della chinasi Syk (o ZAP-70) a un ITAM causa un'alterazione della loro conformazione che determina l'attivazione della loro attività di chinasi, determinando ulteriori eventi di trasduzione nel processo di attivazione. Alcuni recettori inibiscono le risposte cellulari: le loro catene deputate alla trasduzione del segnale contengono motivi leggermente differenti che vengono chiamati **ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs*)** e sono caratterizzati dalla sequenza V/L/IxYxxL, dove V sta per valina. Gli ITIM fosforilati reclutano tirosine fosfatasi o inositolo lipide fosfatasi, enzimi che rimuovono i gruppi fosfato, rispettivamente dalle fosfotirosine o dai fosfolipidi, contrastando l'attivazione causata dai domini ITAM.

Esempi di membri di questa famiglia sono i recettori per l'antigene dei linfociti B e T, i recettori spefici per gli Fc delle IgE espressi dai mastociti

e i recettori per gli Fc, sia attivatori sia inibitori, specifici per le IgG espressi dalle cellule dell'immunità innata e dai linfociti B (Fig. 7-5). Questi recettori formano complessi con le proteine contenenti domini ITAM coinvolte nella trasduzione del segnale, incluse le catene ζ e le proteine CD3 del complesso recettoriale dei linfociti T (*T Cell Receptor*, TCR), le proteine Igα e Igβ associate con gli anticorpi di membrana che rappresentano i recettori per l'antigene dei linfociti B, componenti di molti recettori per l'Fc e NKG2D, il recettore attivatorio delle cellule NK (vedi Cap. 4). I recettori inibitori, quali CD22, FCγRIIB e svariati recettori inibitori delle cellule NK, contengono invece domini ITIM nei loro domini citoplasmatici o nelle proteine a loro associate.

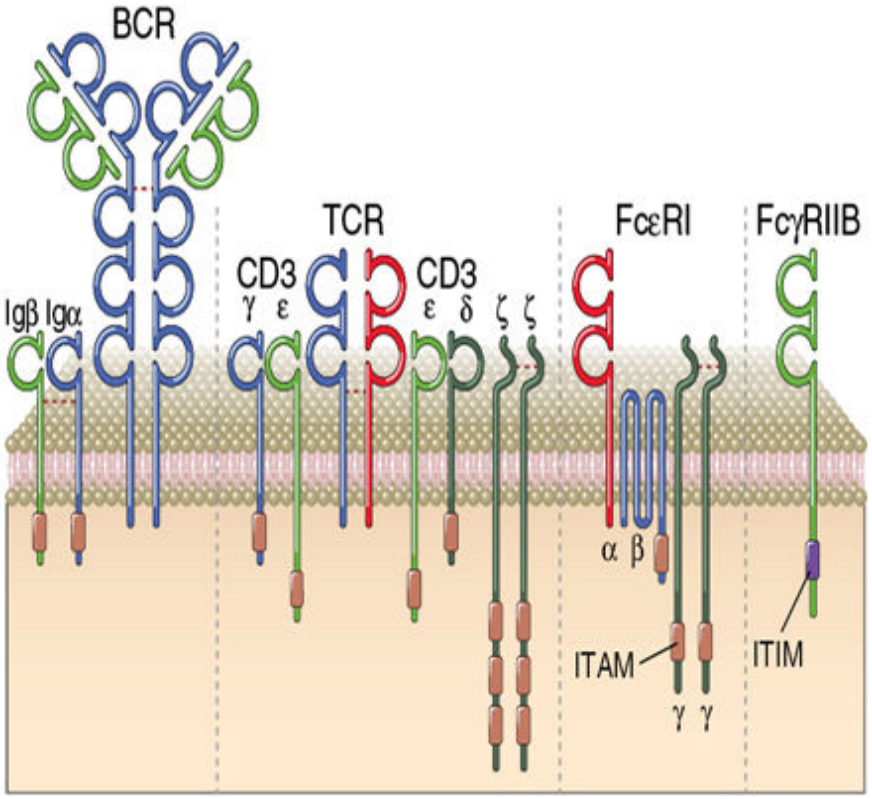


FIGURA 7-5 Esempi di recettori appartenenti alla famiglia dei recettori del sistema immunitario. Normalmente, i recettori del sistema immunitario sono composti da catene deputate al riconoscimento del ligando e da catene che presentano motivi ITAM citoplasmatici. La figura mostra alcuni membri di questa famiglia: il recettore dei linfociti B (BCR), il recettore dei linfociti T (TCR) e il recettore ad alta affinità per le IgE (FcεRI). I recettori inibitori, invece, possiedono generalmente motivi ITIM citoplasmatici e domini di riconoscimento del ligando extracellulari nella stessa catena. Il recettore inibitorio mostrato nella figura, FcγRIIB, è espresso dai linfociti B e dalle cellule mieloidi.

Caratteristiche generali della trasduzione del segnale del recettore per l’antigene

La trasduzione del segnale a valle dei recettori per l’antigene dei linfociti T e B è caratterizzata da una sequenza di eventi simili, qui di seguito schematizzata.

- Il riconoscimento del ligando, in genere multivalente, determina l’aggregazione di molti recettori, cui segue l’attivazione di una chinasi della famiglia Src, a essi associata. Inoltre, tale evento può anche indurre il dispiegamento della coda citoplasmatica di una catena polipeptidica del recettore. Questo cambiamento conformazionale determina l’esposizione dei residui di tirosina di un motivo ITAM (altrimenti nascosti), i quali possono essere fosforilati da chinasi della famiglia Src.
- La chinasi Src attivata fosforila le tirosine presenti sui domini ITAM del complesso recettoriale.
- Ciascuna delle due tirosine fosforilate di ciascun ITAM è riconosciuta da uno dei due domini SH2 di una tirosina chinasi della famiglia Syk.
- Il reclutamento della chinasi Syk determina anche l’attivazione e quindi la fosforilazione delle proteine adattatrici e degli enzimi che attivano diverse vie di trasduzione del segnale a valle del recettore.

Questa sequenza di eventi verrà descritta nel dettaglio più avanti in questo capitolo, quando parleremo della trasduzione del segnale del recettore per l’antigene dei linfociti T e B.

L’entità del segnale trasmesso dal TCR e dal recettore dei linfociti B (**B Cell Receptor*****, *BCR) influenza le risposte dei linfociti in via di sviluppo e attivazione***. In altre parole, i linfociti sono in grado di modulare la loro attivazione sulla base del numero del numero di recettori attivati da un determinato antigene. Per esempio, nella selezione positiva, un processo che avviene durante la maturazione timica dei linfociti T e che ha lo scopo di conservare i linfociti potenzialmente utili per le difese immunitarie, i segnali deboli vengono interpretati come stimolo alla sopravvivenza. Al contrario, i segnali forti possono determinare la morte del linfocita per apoptosi. Inoltre, l’intensità del segnale generato in quest’ambito potrebbe avere un ruolo nell’indirizzare il linfocita verso la differenziazione in CD4 o CD8 (vedi

Cap. 8). La forza dell'attivazione cellulare generata dal TCR e dal BCR può anche influenzare il tipo di risposta immunitaria verso un determinato antigene.

La trasduzione del segnale da parte dei recettori per l'antigene è finemente regolata da tre meccanismi che sono unici di questa classe di recettori.

- *Utilizzo progressivo degli ITAM.* I recettori per l'antigene riescono a generare un'intensità di segnale variabile fosforilando un numero diverso di residui di tirosina nei motivi ITAM. Il complesso del TCR possiede 6 catene deputate alla trasduzione del segnale e 10 domini ITAM; un numero crescente di domini ITAM può essere fosforilato a seconda se il legame dell'antigene al TCR sia più forte o più prolungato. Quindi, il numero di ITAM fosforilati rappresenta l'interpretazione citoplasmatica dell'affinità dell'antigene per il TCR, che in questo modo può influenzare il tipo di risposta cellulare. Il BCR possiede solamente 2 domini ITAM, ma questo numero aumenta quando diverse proteine recettoriali sono aggregate da antigeni multivalenti: in questo caso, il grado di aggregazione influenza il numero di ITAM utilizzati e quindi genera risposte differenti ad antigeni che possiedono diversa affinità e valenza.
- *Aumento dell'attivazione cellulare da parte dei corecettori.* Un **corecettore** è una proteina transmembrana dei linfociti coinvolta nella trasduzione del segnale che, legandosi simultaneamente allo stesso complesso riconosciuto dal recettore per l'antigene, ne facilita l'attivazione. Ciò è possibile perché alla coda citoplasmatica dei recettori sono associati enzimi che, una volta avvicinati al complesso recettoriale, partecipano alla fosforilazione degli ITAM e facilitano l'attivazione cellulare. I corecettori dei linfociti T sono il CD4 e il CD8, che contraddistinguono inoltre i due distinti tipi funzionali di queste cellule. Il corecettore dei linfociti B è il recettore per il complemento di tipo 2 (*Complement Receptor Type 2*, CR2/CD21) (vedi Cap. 12).
- *Modulazione del segnale da parte di recettori inibitori.* I principali **recettori inibitori** dei linfociti T sono CTLA-4 e PD-1, mentre per i linfociti B ricordiamo CD22, FcγRIIB e altri. Il ruolo di questi inibitori verrà descritto più avanti in questo capitolo.

Inoltre, in alcune circostanze i segnali provenienti dal recettore per l'antigene possono cooperare con i segnali di altre proteine chiamate **recettori costimolatori**, che aggiungono un ulteriore livello di controllo al processo di attivazione linfocitaria. I recettori costimolatori forniscono ai linfociti i cosiddetti secondi segnali (il primo segnale è fornito dal riconoscimento dell'antigene) e garantiscono che le risposte immunitarie siano stimolate in modo ottimale da patogeni e da sostanze che simulano i microrganismi (vedi Figg. 4-18 e 9-3). A differenza dei corecettori, essi riconoscono ligandi diversi da quello del recettore per l'antigene; i loro segnali vengono integrati con quelli del recettore per l'antigene e cooperano per attivare in maniera ottimale i linfociti. L'esempio classico di recettore costimolatorio è il CD28, espresso dai linfociti T e attivato dalle molecole costimolatorie B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), che sono espresse dalle cellule che presentano l'antigene (*Antigen Presenting Cells*, APC) in seguito all'attivazione da parte di microbi (vedi Cap. 9).

COMPLESSO RECETTORIALE DEI LINFOCITI T

La scoperta del TCR è avvenuta all'inizio degli anni Ottanta del Novecento, quasi contemporaneamente all'identificazione del suo ligando, ovvero la struttura composta da molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) associate al relativo peptide (vedi Cap. 6). Tale scoperta è avvenuta diversi anni dopo la caratterizzazione del recettore dei linfociti B e dei geni delle Ig. L'approccio usato si basava sull'ipotesi che il TCR fosse simile alle proteine e ai geni delle Ig. Oggi sappiamo che i TCR sono effettivamente simili agli anticorpi, ma anche che ci sono importanti differenze fra questi due tipi di recettori (Tab. 7-1).

TABELLA 7-1 Proprietà dei recettori per l'antigene dei linfociti: recettori delle cellule T (TCR) e immunoglobuline

	TCR	Immunoglobulina (Ig)
Componenti	Catene α e β	Catene pesanti e leggere
Numero di domini Ig	Un dominio V e un dominio C in ciascuna catena	Catena pesante: un dominio V, tre o quattro domini C Catena leggera: un

		dominio V e un dominio C
Numero di CDR coinvolti nel legame con l'antigene	Sei (tre in ogni catena)	Sei (tre in ogni catena)
Molecole associate per la trasduzione del segnale	CD3 e ζ	Igα e Igβ
Affinità per l'antigene (K_d)	10^{-5}-10^{-7} M	10^{-7}-10^{-11} M (Ig secrete)
Modificazioni dopo l'attivazione cellulare		
Produzione della forma secreta	No	Sì
Scambio isotipico	No	Sì
Mutazioni somatiche	No	Sì

Struttura del complesso recettoriale dei linfociti T

Il TCR dei linfociti T helper CD4$^+$ e dei linfociti T CD8$^+$ citotossici (*Cytotoxic T Lymphocytes, *CTL) ristretti per MHC è un eterodimero composto da due catene polipeptidiche transmembrana, denominate α* e *β, unite covalentemente da un ponte disolfuro tra cisteine extracellulari (Fig. 7-6); questi linfociti vengono quindi detti linfociti T αβ. Un secondo tipo di TCR meno comune è composto da catene γ e δ e i linfociti che lo esprimono sono chiamati linfociti T γδ. Sia la catena α sia la β sono formate da un dominio Ig variabile (V) *N*-terminale, da un dominio Ig costante (C), da una regione idrofobica transmembrana e da una breve sequenza intracitoplasmatica. In pratica, la porzione extracellulare dell'eterodimero TCR αβ è strutturalmente simile al frammento che lega l'antigene (*Fragment antigen binding*, Fab) degli anticorpi, il quale è composto dalle regioni V e C di una catena leggera e dalle regioni V e C di una catena pesante (vedi Cap. 5).

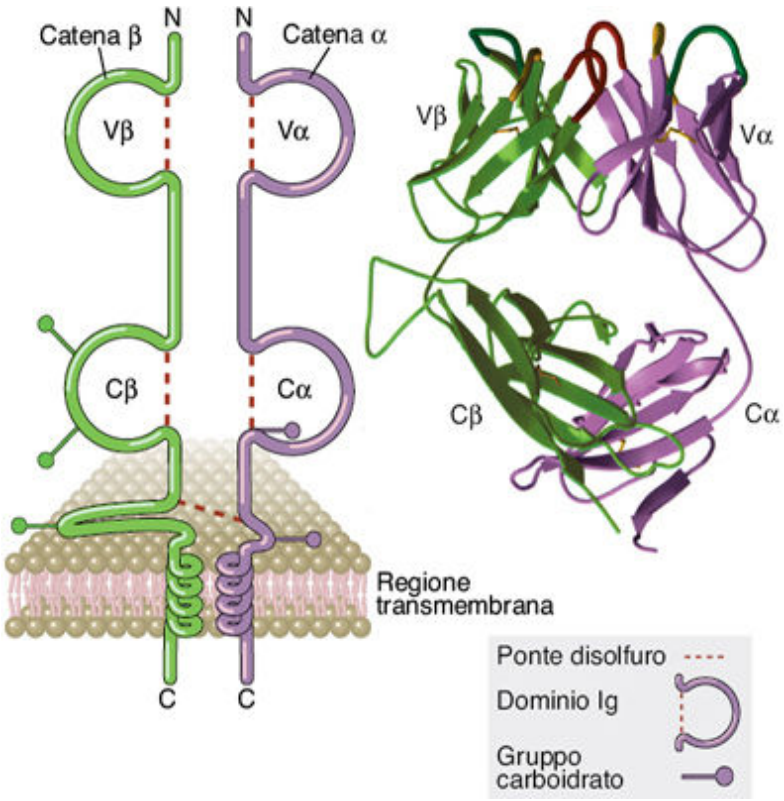


FIGURA 7-6 Struttura del TCR. Rappresentazione schematica dei domini di un TCR αβ (*a sinistra*) specifico per un complesso peptide-MHC. La porzione del TCR che lega l'antigene è formata dai domini Vα e Vβ. Il diagramma a nastro (*a destra*) mostra la struttura della porzione extracellulare di un TCR ricavata dall'analisi cristallografica ai raggi X. Le anse dei segmenti ipervariabili che formano il sito di legame del complesso peptide-MHC sono posizionate nella parte superiore della figura. (*Modificata da Bjorkman PJ. MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions. Cell 89:167-170, 1997. Copyright © Cell Press.*)

Le regioni V delle catene α e β contengono brevi sequenze nelle quali si concentra la variabilità tra i diversi TCR; queste regioni ipervariabili costituiscono le cosiddette "regioni che determinano la complementarietà" (*Complementarity-Determining Regions*, CDR). Tre CDR della catena α e tre della catena β costituiscono la porzione del TCR che riconosce in modo specifico i complessi MHC-peptide (Fig. 7-7). Il dominio V della catena β contiene una quarta regione ipervariabile che non sembra partecipare al riconoscimento dell'antigene, ma rappresenta il sito di legame per prodotti microbici denominati *superantigeni* (vedi Cap. 15). Ciascuna catena del TCR, in modo simile alla catena pesante e a quella leggera delle Ig, è codificata da molteplici segmenti genici che vengono uniti durante la maturazione dei linfociti T (vedi Cap. 8).

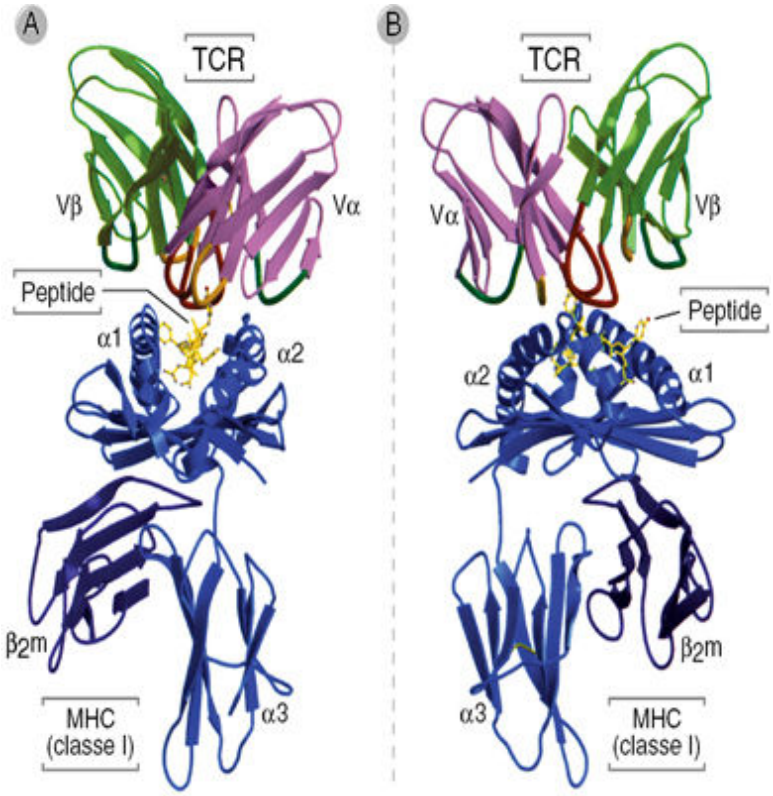


FIGURA 7-7 Legame del TCR al complesso peptide-MHC. La figura mostra l'interazione dei domini V di un TCR con una molecola MHC di classe I (HLA-A2) che presenta un peptide virale (*in giallo*). In **A** è mostrata una veduta frontale e in **B** una veduta laterale della struttura cristallina del complesso trimolecolare MHC-peptideTCR, ottenuta ai raggi X. (*Da Bjorkman PJ. MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions. Cell 89:167-170, 1997. Copyright © Cell Press.*)

Le regioni C delle catene α e β si estendono in una breve regione cerniera, la quale contiene residui di cisteina responsabili della formazione del ponte disolfuro che unisce le due catene. La regione cerniera è seguita dalla porzione idrofobica transmembrana, che presenta una caratteristica insolita quale la presenza di residui aminoacidici con carica positiva, tra cui una lisina nella catena α e un residuo di lisina e uno di arginina nella catena β. Questi residui interagiscono con aminoacidi di carica opposta presenti nelle porzioni transmembrana di altre proteine che fanno parte del complesso del TCR, ovvero il complesso CD3 e le catene ζ che descriveremo nel paragrafo seguente. Le catene α e β del TCR presentano brevi code citoplasmatiche C-terminali di 5-12 aminoacidi che, come anche nel caso delle Ig di membrana dei linfociti B (vedi più avanti), sono troppo corte per trasdurre segnali, infatti tale funzione viene svolta dalle altre molecole associate al TCR.

Le proteine CD3 e ζ sono associate in modo non covalente agli eterodimeri α e β, formando così il complesso del TCR, e sono deputate alla trasduzione del segnale generato dal riconoscimento dell'antigene. Le componenti del complesso del TCR sono illustrate nelle Figure 7-8 e 7-9. Le proteine CD3 e la catena ζ sono identiche in tutti i linfociti T, indipendentemente dalla loro specificità, in accordo con il loro ruolo di molecole deputate alla trasduzione del segnale e non al riconoscimento dell'antigene. Le proteine CD3 sono necessarie anche per l'espressione sulla membrana dei linfociti T del complesso recettoriale completo.

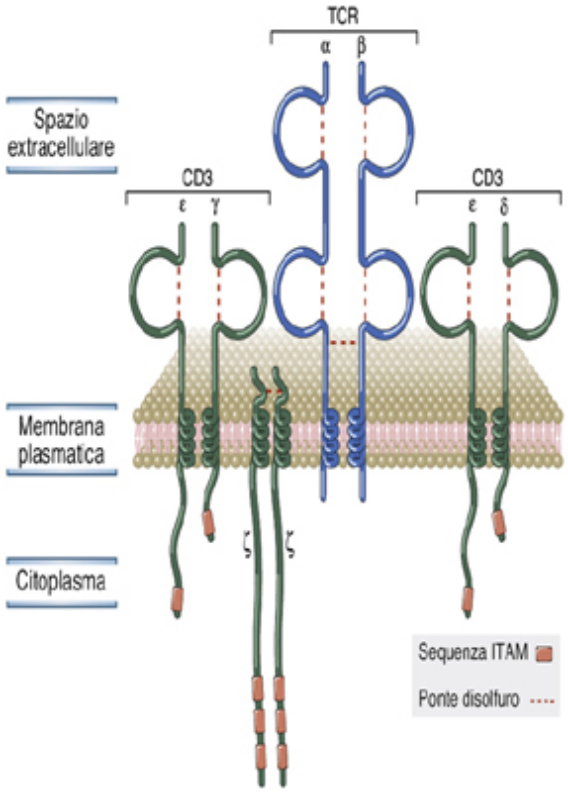
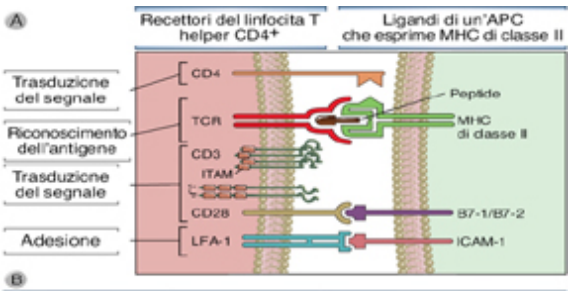


FIGURA 7-8 Componenti del complesso del TCR. Il complesso del TCR espresso dai linfociti T ristretti per MHC è formato dal TCR αβ associato in modo non covalente al CD3 e alle proteine ζ. Le associazioni tra le diverse proteine sono dovute alla presenza di residui con carica complementare, presenti nelle regioni transmembrana (non mostrate in figura).



B

Molecola accessoria espressa dal linfocita T	Funzione	Ligando	
		Nome	Espresso da
CD3	Trasduzione del segnale del complesso TCR	Nessuno	
ζ	Trasduzione del segnale del complesso TCR	Nessuno	
CD4	Trasduzione del segnale	MHC di classe II	Cellule che presentano l'antigene
CD8	Trasduzione del segnale	MHC di classe I	Tutte le cellule nucleate
CD28	Trasduzione del segnale (costimolazione)	B7-1/B7-2	Cellule che presentano l'antigene
CTLA-4	Trasduzione del segnale (regolazione negativa)	B7-1/B7-2	Cellule che presentano l'antigene
PD-1	Trasduzione del segnale (regolazione negativa)	PD-L1/PD-L2	Cellule che presentano l'antigene, cellule tissutali, cellule tumorali
LFA-1	Adesione	ICAM-1	Cellule che presentano l'antigene, endotelio

FIGURA 7-9 Coppie ligando-recettore coinvolte nell'attivazione dei linfociti T. A. La figura mostra le principali molecole di membrana responsabili dell'attivazione dei linfociti T $CD4^+$ (i recettori) e le molecole da essi riconosciute sulle APC (i ligandi). I linfociti T $CD8^+$ utilizzano perlopiù le stesse molecole, ricordando però che il TCR riconosce complessi peptide-MHC di classe I e che il corecettore è il CD8, che lega MHC di classe I. Gli ITAM sono le regioni che vengono fosforilate in tirosina, divenendo così siti di ancoraggio per altre molecole coinvolte nella trasduzione del segnale. Il CD3 è composto da tre catene polipeptidiche chiamate γ, δ e ε, accoppiate a due a due (γε e δε), come mostrato nella Figura 7-8. **B.** Schema riassuntivo delle caratteristiche più importanti delle principali molecole "accessorie" dei linfociti T, così chiamate perché prendono parte alla risposta verso l'antigene pur non essendone i recettori. CTLA-4 (CD152) è un recettore per le molecole B7 che trasmette segnali inibitori; il suo ruolo nello spegnimento delle risposte dei linfociti T viene descritto nel Capitolo 9. APC (*Antigen Presenting Cell*), cellula che presenta l'antigene; ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), molecola di adesione intercellulare; LFA-1 (*Leukocyte Function-Associated Antigen*), antigene associato alla funzione leucocitaria 1; MHC (*Mayor Histocompatibility Complex*), complesso maggiore di istocompatibilità; TCR (*T Cell Receptor*), recettore dei linfociti T.

Il complesso CD3 in realtà consiste in tre proteine che sono denominate CD3 γ, δ e ε, omologhe fra loro. Esse contengono un dominio Ig nella regione *N*-terminale extracellulare e dunque appartengono alla superfamiglia delle Ig. I segmenti transmembrana di tutte e tre le catene del CD3 contengono un residuo di acido aspartico caricato negativamente che interagisce con i residui di segno opposto dei domini transmembrana delle

catene α e β del TCR. In pratica, ogni "complesso del TCR" è costituito da un dimero αβ associato a un eterodimero CD3 δε, un eterodimero CD3 γε e un omodimero ζζ, quest'ultimo stabilizzato covalentemente da un ponte disolfuro.

I domini citoplasmatici delle catene γ, δ e ε hanno una lunghezza compresa tra 44 e 81 aminoacidi e presentano ciascuno un dominio ITAM. La catena ζ è costituita da una breve regione extracellulare di 9 aminoacidi, una regione transmembrana che contiene un residuo di acido aspartico carico negativamente (analogamente alle catene del CD3) e un lungo dominio citoplasmatico (113 aminoacidi) che contiene tre sequenze ITAM. Nella maggior parte dei linfociti T la catena ζ è espressa come omodimero. La catena ζ si associa anche ad altri recettori coinvolti nella trasduzione del segnale in cellule diverse dai linfociti T, come per esempio il recettore Fcγ (FcγRIII) delle cellule NK.

Trasduzione del segnale da parte del complesso recettoriale dei linfociti T

Quando il TCR lega il complesso MHC-peptide, i corecettori si aggregano al TCR e ciò permette la fosforilazione delle tirosine degli ITAM. Questa fosforilazione innesca la cascata di trasduzione del segnale e l'attivazione a valle delle tirosine chinasi, le quali a loro volta fosforilano residui di tirosina presenti su altre proteine adattatrici. Le fasi successive dipendono dal reclutamento specifico di alcuni enzimi chiave, ciascuno dei quali dà inizio a una distinta via di trasduzione.

Si pensa che il TCR, così come altri recettori del sistema immunitario, si attivi quando molte catene vengono aggregate (*cross-linking*), in seguito al riconoscimento simultaneo di epitopi antigenici adiacenti. Il cross-linking del TCR pone tuttavia un problema speciale rispetto a quello degli altri recettori. Esso, infatti, richiederebbe la presenza sull'APC di un'alta densità di complessi MHC-peptide identici, mentre si sa che questi ne esprimono generalmente molto pochi, forse meno di 100 per cellula (vedi Cap. 6). Come avviene dunque, realmente, l'inizio della trasduzione del segnale del TCR? Il riconoscimento del complesso MHC-peptide potrebbe indurre cambiamenti conformazionali nel TCR in grado di rendere gli ITAM associati alle catene CD3 o ζ accessibili alla fosforilazione della tirosina da

parte delle chinasi Src. I corecettori CD4 e CD8, che saranno descritti più avanti, facilitano il processo di attivazione avvicinando Lck, debolmente associata alle loro code citoplasmatiche, agli ITAM delle catene CD3 e ζ. Il reale meccanismo della trasduzione del segnale deve ancora essere determinato con certezza. Alla fine, tra il linfocita T e l'APC si forma un'interfaccia stabile che viene denominata sinapsi immunologica (vedi più avanti).

Ruolo dei corecettori CD4 e CD8 nell'attivazione dei linfociti T

CD4 e CD8 sono corecettori espressi dai linfociti T che legano regioni non polimorfe delle molecole MHC e facilitano la trasduzione del segnale del TCR (vedi Fig. 7-9). Queste proteine sono chiamate corecettori in quanto, legando molecole MHC, riconoscono parte dello stesso ligando (ovvero il complesso MHC-peptide) che interagisce con il TCR. I linfociti T αβ maturi esprimono il CD4 oppure il CD8, ma mai entrambe le molecole. Il CD4 e il CD8, interagendo rispettivamente con le molecole MHC di classe II e di classe I, sono responsabili della restrizione per MHC delle rispettive sottopopolazioni (vedi Fig. 7-9 e Cap. 6).

Il CD4 e il CD8 sono glicoproteine transmembrana appartenenti alla superfamiglia delle Ig (Fig. 7-10). Il CD4 è un monomero espresso dai linfociti T periferici e dai timociti ed è presente in quantità inferiori anche sui fagociti mononucleati e su alcune cellule dendritiche. Il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) utilizza CD4 come recettore per poter infettare i linfociti T e altre cellule del sistema immunitario che esprimono tale molecola. CD4 è costituito da quattro domini Ig extracellulari, una regione idrofobica transmembrana e una coda citoplasmatica altamente basica di 38 aminoacidi. I due domini Ig ***N***-terminali legano i domini non polimorfi α2 e β2 delle molecole MHC di classe II.

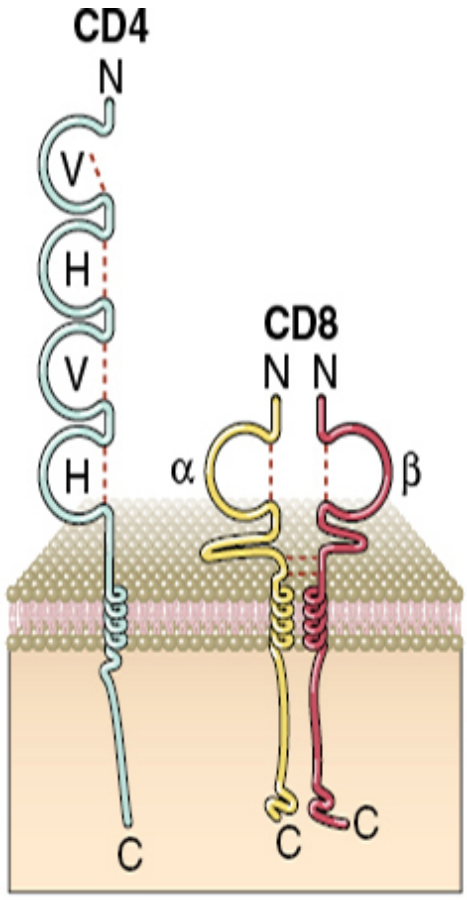


FIGURA 7-10 Visualizzazione schematica della struttura dei corecettori CD4 e CD8. La proteina CD4 è un monomero integrale di membrana formato da quattro domini Ig extracellulari, un dominio transmembrana e una coda citoplasmatica. La proteina CD8 è un eterodimero αβ integrale di membrana legato da un ponte disolfuro oppure un omodimero αα legato da un ponte disolfuro (non mostrato in figura). Ogni catena ha un singolo dominio Ig extracellulare. Le parti citoplasmatiche di CD4 e CD8 possono associarsi a Lck (non mostrato in figura).

Il CD8 è espresso nella maggior parte delle cellule come eterodimero costituito da due catene, chiamate CD8α e CD8β, legate da ponti disolfuro (vedi Fig. 7-10). Sia la catena α sia quella β hanno un singolo dominio Ig extracellulare, una regione idrofobica transmembrana e una coda citoplasmatica, altamente basica, di circa 25 aminoacidi. Il dominio Ig terminale di CD8 si lega principalmente al dominio non polimorfo α3 della molecola MHC di classe I e interagisce anche con porzioni del dominio α2 e con la microglobulina β2. Alcuni linfociti T attivati e di memoria esprimono omodimeri αα di CD8 e questa diversa forma potrebbe avere una funzione inibitoria invece che attivatoria, probabilmente perché è esclusa dai microdomini deputati alla trasduzione chiamati raft lipidici. Questi

omodimeri sono presenti anche in una sottopopolazione di cellule dendritiche murine (vedi Cap. 6).

La coda citoplasmatica del CD4 e del CD8 lega Lck, una chinasi della famiglia Src. La capacità da parte dei domini extracellulari di questi corecettori di legarsi alle molecole MHC aiuta queste proteine a trovarsi in stretto contatto con il TCR che riconosce lo stesso complesso MHC-peptide sull'APC: di conseguenza, sul versante citosolico della membrana, Lck viene a trovarsi molto vicino agli ITAM delle catene CD3 e ζ e fosforila i residui di tirosina di questi ITAM, permettendo il successivo reclutamento e l'attivazione della tirosina chinasi ZAP-70.

Ruolo delle tirosine chinasi e di una chinasi lipidica nell'attivazione dei linfociti T

La fosforilazione delle proteine e dei lipidi è fondamentale per la trasduzione del segnale da parte del complesso del TCR e dei suoi corecettori. Anche prima dell'attivazione del TCR è presente un livello basale di fosforilazione delle tirosine dei domini ITAM e un reclutamento di ZAP-70 a questi ITAM fosforilati, descritto più avanti. Dopo pochi secondi dal legame del TCR, Lck viene portata vicino ai residui di tirosina dei domini ITAM delle catene CD3 e ζ, che vengono così ampiamente fosforilate (Fig. 7-11) Oltre a Lck che, come abbiamo già detto, è associata ai corecettori, nell'ambito del complesso del TCR esiste un'altra tirosina chinasi citoplasmatica della famiglia Src, chiamata Fyn, che è fisicamente associata al CD3 e che potrebbe contribuire alla fosforilazione costitutiva dei domini ITAM. Topi privi di Lck evidenziano un grave deficit di sviluppo dei linfociti T e della trasduzione del segnale del TCR e topi privi sia di Lck sia di Fyn mostrano deficit ancora più gravi.

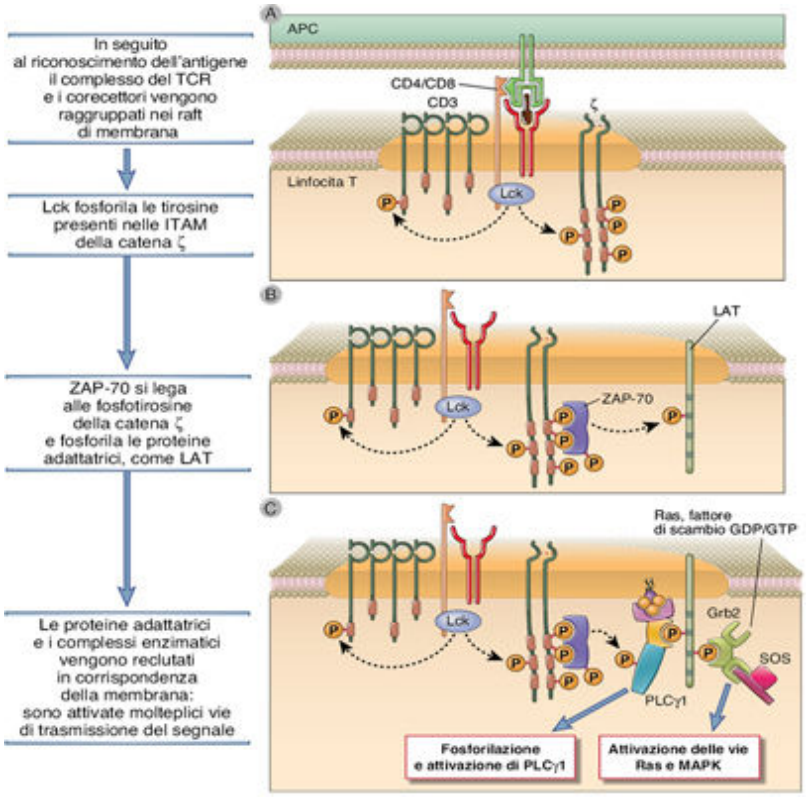


FIGURA 7-11 Eventi precoci di fosforilazione delle tirosine durante l'attivazione dei linfociti T. Dopo il riconoscimento dell'antigene, si verifica l'aggregazione dei complessi TCR e dei corecettori (CD4, in questo caso). Lck associata al CD4 si attiva e fosforila le tirosine presenti nelle sequenze ITAM del CD3 e delle catene ζ **(A).** ZAP-70 si lega alla tirosina fosforilata della catena ζ e viene essa stessa attivata mediante fosforilazione. (L'illustrazione mostra una molecola ZAP-70 che si lega a due fosfotirosine di un ITAM della catena ζ, ma è probabile che l'inizio di una risposta T richieda l'assemblaggio di molteplici molecole ZAP-70 su ogni catena ζ.) Una volta attivata, ZAP-70 fosforila in successione molecole adattatrici, come LAT **(B).** Le proteine adattatrici diventano siti di ancoraggio per enzimi intracellulari come PLCγ1 e proteine che attivano Ras e altre proteine G a basso peso molecolare a monte delle MAP chinasi **(C)**: questi enzimi sono responsabili dell'attivazione delle varie risposte cellulari.

Le sequenze ITAM della catena ζ una volta fosforilate in tirosina formano dei siti di ancoraggio per una tirosina chinasi della famiglia Syk denominata **ZAP-70** *(ζ-Associated Protein of 70 kD*). ZAP-70 contiene due domini SH2 in grado di legare le fosfotirosine degli ITAM. Ogni ITAM ha due residui tirosinici ed entrambi devono essere fosforilati per formare un sito di ancoraggio per una molecola ZAP-70. Dopo essersi associata alla catena ζ, la chinasi ZAP-70 diventa un substrato per Lck a essa adiacente. Questo processo innesca l'attività tirosinchinasica di ZAP-70 che è ora in grado di fosforilare altri substrati coinvolti nella trasduzione del segnale. È necessario il raggiungimento di una soglia critica di attivazione, affinché la cascata

della trasduzione possa proseguire; questa soglia viene raggiunta mediante il reclutamento di molteplici molecole ZAP-70 in corrispondenza delle numerose sequenze ITAM fosforilate delle catene ζ e del CD3.

Un'altra via di trasduzione del segnale coinvolta nell'attivazione dei linfociti T è costituita dall'attivazione della **chinasi PI3**, che fosforila i fosfatidilinositoli di membrana (Fig. 7-12). Questo enzima viene reclutato dal citoplasma al foglietto interno della membrana dal complesso del TCR e qui genera PIP3 a partire dal fosfatidilinositolo bifosfato (PIP2). Alcune proteine citoplasmatiche coinvolte nella trasduzione del segnale hanno domini specializzati PH con affinità per PIP3 e dunque le proteine che contengono domini PH possono legarsi alla superficie interna della membrana solo quando viene generato PIP3. Esempi di proteine che contengono domini PH sono alcune tirosina chinasi come Itk nei linfociti T e Btk nei linfociti B. Un'altra chinasi che dipende da PIP3 è PDK1, responsabile dell'attivazione di un'altra fondamentale proteina chinasi chiamata Akt. La proteina Akt attivata fosforila bersagli cruciali e contribuisce alla sopravvivenza cellulare in vari modi, tra cui l'inattivazione dei membri pro-apoptotici della famiglia Bcl-2.

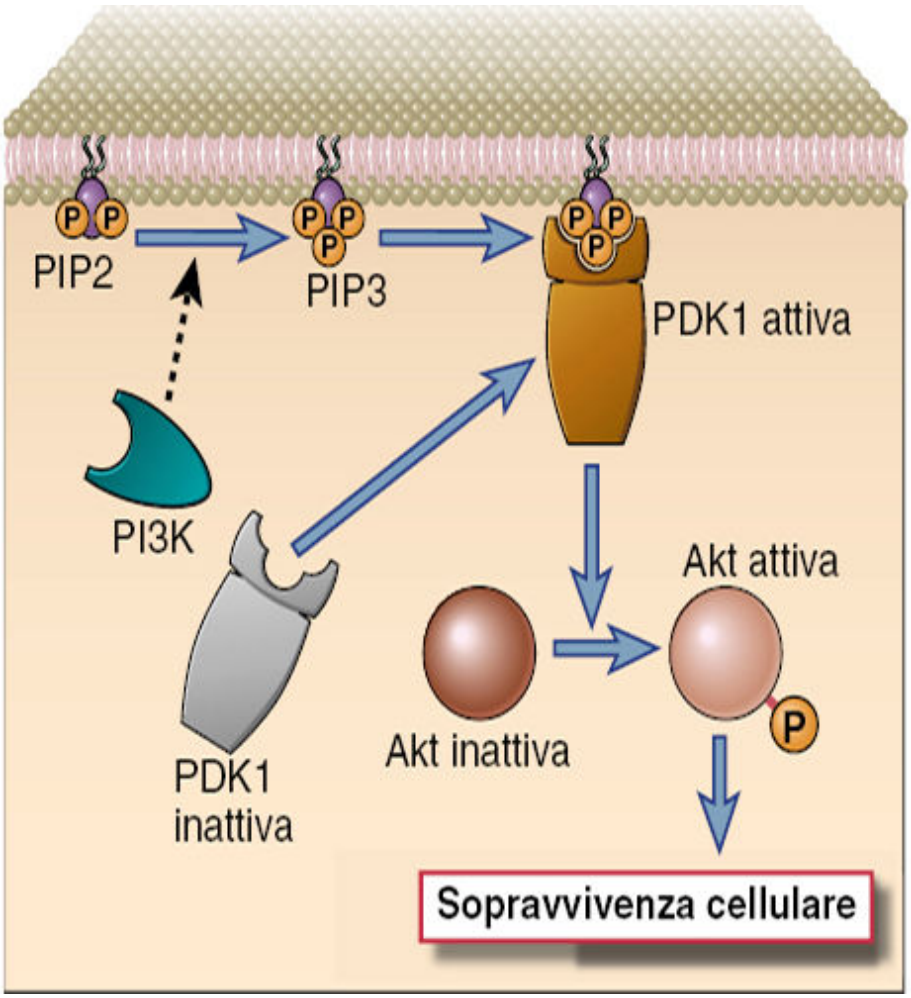


FIGURA 7-12 Ruolo della chinasi PI3 nella risposta dei linfociti T. Il PIP3 di membrana, generato dalla chinasi PI3 (PI3K), attiva la chinasi PDK1, che attiva mediante fosforilazione la chinasi Akt, che a sua volta fosforila bersagli a valle che inducono la sopravvivenza cellulare.

Reclutamento e modificazione delle proteine adattatrici

Dopo l'attivazione, ZAP-70 fosforila numerosi substrati che fungono da proteine adattatrici per il legame di altre molecole coinvolte nella trasduzione del segnale (vedi Fig. 7-11). Un evento precoce di particolare importanza è rappresentato dalla fosforilazione in tirosina delle proteine adattatrici SLP-76 e LAT a opera di ZAP-70. Una volta fosforilata, LAT lega la fosfolipasi Cγ1 (PLCγ1), che è un enzima chiave nell'attivazione dei linfociti T (trattato oltre), e coordina il reclutamento di numerose altre proteine adattatrici (come SLP-76, GADS e Grb-2) al "complesso del TCR-proteine associate", spesso identificato con il nome di segnalosoma. Pertanto, LAT serve a raggruppare componenti della trasduzione del segnale

nelle vicinanze degli attivatori collocati in prossimità del TCR. Poiché la funzione di molte proteine adattatrici dipende dalla fosforilazione in tirosina da parte di ZAP-70 attivata, solo il riconoscimento dell'antigene (ossia lo stimolo fisiologico per l'attivazione di ZAP-70) innesca le vie di trasduzione del segnale che portano alla risposta funzionale dei linfociti T.

Formazione della sinapsi immunologica

Il riconoscimento dei complessi peptide-MHC da parte del TCR provoca il reclutamento di diverse proteine di membrana e citoplasmatiche nel sito di contatto tra il linfocita T e l'APC (Fig. 7-13). La regione di contatto del linfocita T con l'APC è identificata con il nome di **sinapsi immunologica** o **SMAC** (*SupraMolecular Activation Cluster*). Le molecole che vengono rapidamente reclutate verso il centro della sinapsi includono il complesso del TCR (TCR, CD3 e catene ζ), i corecettori CD4 o CD8, i recettori per le molecole costimolatorie (come CD28), enzimi come la proteina chinasi θ (PKC-θ) e le proteine adattatrici citoplasmatiche associate alle code dei recettori di membrana. In questa regione della sinapsi, che prende il nome di c-SMAC (*central SMAC*), la distanza tra la membrana plasmatica del linfocita e quella dell'APC è di circa 15 nm. Le integrine rimangono nelle regioni periferiche della sinapsi, dove hanno il compito di stabilizzare il legame del linfocita T all'APC formando la regione periferica di SMAC chiamata p-SMAC. In questa parte della sinapsi, le due membrane distano circa 40 nm. Molte delle molecole coinvolte nella trasduzione del segnale si localizzano dapprima in regioni della membrana citoplasmatica caratterizzate da un peculiare contenuto lipidico, che vengono identificate con il nome di raft lipidici o microdomini glicolipidici. In questi microdomini ha inizio l'attivazione del TCR e dei recettori costimolatori che portano al riarrangiamento del citoscheletro, il quale permette ai raft di unirsi a formare la sinapsi immunologica.

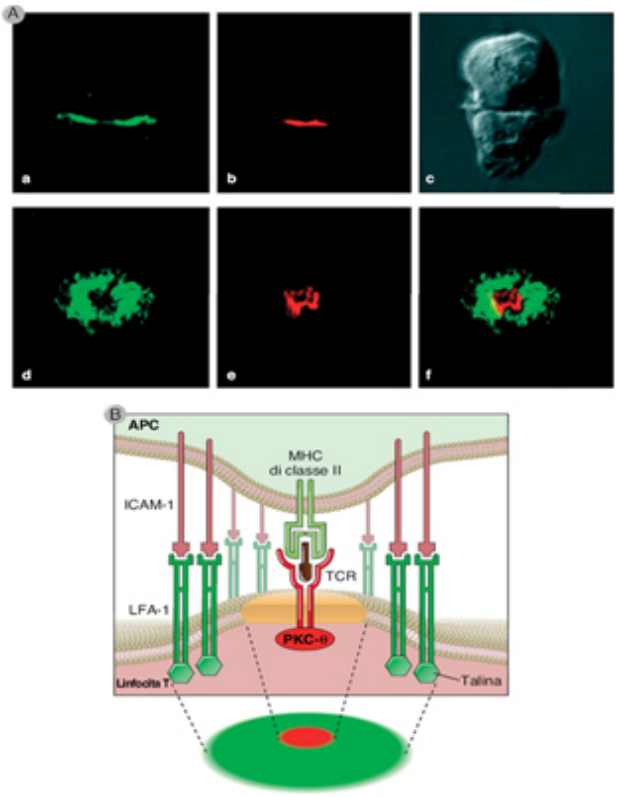


FIGURA 7-13 Sinapsi immunologica. A. Questa figura mostra due vedute della sinapsi immunologica in un coniugato di un linfocita T con l'APC (mostrato sotto forma di immagine Nomarski nel riquadro c). La talina, una proteina associata alla coda citoplasmatica dell'integrina LFA-1, è evidenziata con un anticorpo marcato con una sonda verde fluorescente e la PKC-θ, associata al complesso del TCR, è visualizzata con un anticorpo coniugato a una sonda fluorescente rossa. Nei riquadri a e b è mostrata una sezione ottica bidimensionale del sito di contatto sull'asse x-y. Nei riquadri d-f viene mostrata una visione tridimensionale dell'intera regione di contatto cellula-cellula sull'asse x-z. Si notino la localizzazione centrale di PKC-θ e l'accumulo periferico di talina. **B.** Rappresentazione schematica della sinapsi, che mostra la talina e LFA-1 localizzate nella p-SMAC (*in verde*) e la PKC-θ e il TCR nella c-SMAC (*in rosso*). (***A,*** *Per gentile concessione di Macmillan Publishers Ltd. Da Monks CRF, Freiburg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A: Three dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells, Nature 395:82–86. Copyright © 1998.*)

Le sinapsi immunologiche assolvono ad alcune funzioni durante e dopo l'attivazione dei linfociti T.

- La sinapsi rappresenta un punto di contatto stabile tra il linfocita T e l'APC che presenta l'antigene e costituisce il sito di assemblaggio della "macchina" della trasduzione del segnale del linfocita (comprendente il complesso del TCR, i corecettori, i recettori costimolatori e le proteine adattatrici). La sinapsi immunologica in sé costituisce una regione preferenziale per l'attivazione del TCR, sebbene la trasduzione del

segnale del TCR inizi prima della formazione della sinapsi e sia anzi necessaria per la sua formazione. La sinapsi rappresenta infatti una regione in cui è facilitato l'ingaggio ripetuto dei TCR da parte dei pochi complessi MHC-peptide presenti sulla membrana dell'APC. Questo fenomeno permette quindi alle poche molecole MHC che montano il peptide specifico di promuovere una trasduzione del segnale protratta ed efficace.

- La sinapsi permette un rilascio "direzionato" del contenuto di granuli secretori e citochine dal linfocita T verso l'APC o la cellula bersaglio che prende parte alla sinapsi stessa. L'esempio classico è il rilascio vettoriale di granuli contenenti perforina e granzimi effettuato dai CTL per uccidere in maniera selettiva le cellule bersaglio (vedi Cap. 11). Anche le interazioni CD40L-CD40 sono facilitate dall'accumulo di queste due proteine a livello della sinapsi immunologica. Nelle regioni delle sinapsi anche alcune citochine vengono secrete in modo direzionale verso la cellula che sta presentando l'antigene al linfocita T.
- La sinapsi rappresenta anche il sito preferenziale di degradazione delle molecole coinvolte nella trasduzione del segnale, che avviene principalmente mediante monoubiquitinazione e ingresso nella via di degradazione endosomiale e lisosomiale e contribuisce a spegnere l'attivazione dei linfociti T, come discusso più avanti.

MAP chinasi nella trasduzione del segnale dei linfociti T

Le proteine G a basso peso molecolare, attivate dal riconoscimento dell'antigene, stimolano per lo meno tre diverse MAP (**Mitogen-Activated Protein*****) chinasi, che a loro volta attivano diversi fattori trascrizionali***. Le proteine G sono coinvolte in diverse di risposte di differenti tipi cellulari. I due membri principali di questa famiglia attivati a valle del TCR sono Ras e Rac. Ciascuna attiva un diverso fattore (o gruppo di fattori) trascrizionale e insieme sono responsabili di molte delle risposte cellulari.

- La via di **Ras** viene attivata in seguito al riconoscimento dell'antigene e porta all'attivazione di fattori trascrizionali attraverso l'attivazione della proteina chinasi ERK (*Extracellular Receptor-activated Kinase*), membro della famiglia delle MAP chinasi. Ras è debolmente associata alla membrana plasmatica mediante lipidi legati covalentemente. Nella

sua forma inattiva, il sito di legame del nucleotide guaninico è occupato da una molecola di guanosina difosfato (*Guanosine DiPhosphate*, GDP); quando il GDP è rimpiazzato dal guanosina trifosfato (*Guanosine TriPhosphate*, GTP), Ras subisce un cambiamento conformazionale e può reclutare o attivare numerosi enzimi cellulari, il più importante dei quali è c-Raf. L'attivazione di molti recettori, incluso il TCR nei linfociti T, induce l'attivazione di Ras mediante lo scambio GDP/GTP. Le proteine Ras mutate che diventano costitutivamente attive (cioè si trovano costantemente nella conformazione legata al GTP) sono spesso associate a trasformazione neoplastica. Di fatto, le proteine Ras sono GTPasi che convertono il GTP a esse legato in GDP, riportandosi così allo stato normale inattivo.

- Il meccanismo di attivazione di Ras nei linfociti T coinvolge le proteine adattatrici LAT e Grb-2 (Fig. 7-14). L'attivazione della chinasi ZAP-70 induce la fosforilazione della proteina adattatrice LAT che diventa così "sito di ancoraggio" per il dominio SH2 della proteina adattatrice GrB-2. GrB-2, a sua volta, recluta in membrana la proteina SOS (omologa di una proteina di *Drosophila* detta *Son Of Sevenless*), la quale catalizza lo scambio GDP/GTP su Ras. In questo modo si genera la forma di Ras legata a GTP (indicata come Ras•GTP) che attiva una cascata di tre MAP chinasi in sequenza, le prime due delle quali fosforilano e attivano la chinasi successiva nella cascata. L'ultima MAP chinasi di questa cascata. per l'appunto ERK. Ecco il dettaglio della cascata: il complesso Ras•GTP attiva la chinasi c-Raf, la quale attiva una chinasi dotata di duplice specificità che fosforila ERK a livello di residui di treonina e tirosina strettamente adiacenti. Questa chinasi a duplice specificità costituisce un esempio di chinasi che attiva una MAP chinasi, detta *MAP chinasi chinasi* (MAPKK). Una volta attivata, ERK trasloca al nucleo e fosforila un proteina chiamata Elk, che a sua volta stimola la trascrizione di c-Fos, un componente di un fattore di trascrizione noto con il nome di AP-1 (*Activating Protein-1*).
- Parallelamente all'attivazione di Ras da parte di Grb-2 e SOS, le molecole adattatrici fosforilate reclutano e attivano una proteina di scambio GTP/GDP detta **Vav**, che agisce su un'altra proteina G a basso peso molecolare chiamata **Rac** (vedi Fig. 7-14). Il complesso Rac•GTP innesca una cascata di MAP chinasi parallela a quella attivata da Ras,

che porta all'attivazione di una diversa proteina della famiglia delle MAP chinasi chiamata JNK (c-*Jun N-terminal Kinase*). JNK è anche chiamata SAP (*Stress Activated Protein*) poiché in molte cellule è attivata da stimoli nocivi. Una volta attivata, JNK fosforila c-Jun, il secondo componente del fattore di trascrizione AP-1. Un terzo membro della famiglia delle MAP chinasi, oltre a ERK e JNK, è p38, una proteina chinasi attivata da Rac•GTP, che a sua volta ha il compito di attivare fattori trascrizionali. Rac•GTP provoca anche la riorganizzazione del citoscheletro ed è verosimilmente responsabile dell'aggregazione dei complessi del TCR, dei corecettori e di altre molecole di trasduzione a livello della sinapsi immunologica.

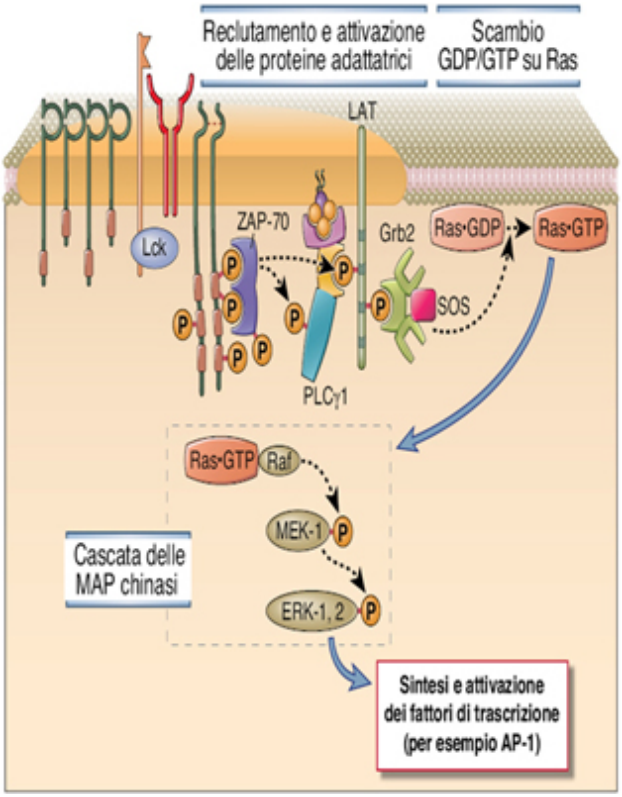


FIGURA 7-14 La via di Ras e delle MAP chinasi nell'attivazione dei linfociti T. La chinasi ZAP-70, attivata dal riconoscimento dell'antigene (vedi Fig. 9-7), fosforila alcune proteine adattatrici associate alla membrana (come la proteina LAT) che si legano a loro volta a un'altra proteina adattatrice, Grb-2, che fornisce un sito di ancoraggio per il fattore di scambio GTP/GDP denominato SOS. SOS converte il complesso Ras•GDP in Ras•GTP. Quest'ultimo attiva una cascata enzimatica, che culmina nell'attivazione di ERK, un membro della famiglia delle MAP chinasi. In parallelo, la via di Rac attiva JNK, un altro membro della famiglia delle MAP chinasi (non mostrato in figura).

L’attività di ERK e JNK, e con essa l’attivazione del linfocita T, viene infine terminata attraverso un meccanismo a feedback negativo che comporta l’azione di fosfatasi a doppia specificità (tirosina/treonina) attivate dalle stesse ERK e JNK.

Calcio e proteina chinasi C nella trasduzione del segnale dei linfociti T

La trasduzione del segnale del TCR porta all’attivazione dell’isoforma γ1 dell’enzima fosfolipasi C (PLCγ1). Essa catalizza l’idrolisi di fosfolipidi di membrana, dalla quale derivano prodotti che attivano enzimi che portano all’attivazione di specifici fattori trascrizionali (Fig. 7-15). La fosfolipasi PLCγ1, un enzima citoplasmatico specifico per i fosfolipidi che contengono inositolo, viene reclutata nell’arco di alcuni minuti dall’attivazione del TCR a livello della membrana plasmatica da parte di LAT nella sua forma fosforilata in tirosina. Una volta fosforilata a opera di ZAP-70 e di altre chinasi, come Itk della famiglia Tec, PLCγ1 catalizza l’idrolisi di un fosfolipide di membra na chiamato fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato (PIP2), con formazione di due prodotti, l’inositolo 1,4,5-trifosfato (IP3) e il diacilglicerolo (DAG) che rimane in membrana. L’IP3 e il DAG attivano poi due distinte vie di trasduzione del segnale.

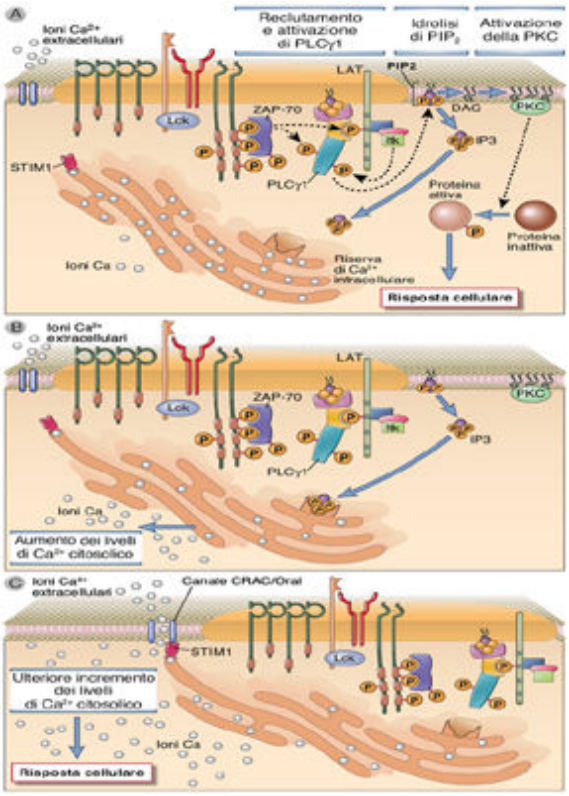


FIGURA 7-15 Meccanismi a valle di PLCγ1 durante l'attivazione dei linfociti T. A. La proteina adattatrice LAT, fosforilata in seguito all'attivazione cellulare, si lega all'enzima citosolico PLCγ1, che è stato a sua volta attivato mediante fosforilazione da parte di ZAP-70 o di altre chinasi, come Itk. PLCγ1 attivata idrolizza PIP2 di membrana per generare IP3, che causa l'aumento della concentrazione di calcio intracellulare, e il DAG, che attiva l'enzima PKC. **B.** IP3 causa la deplezione di calcio dal reticolo endoplasmatico, che è percepita da STIM1. PKC induce svariate risposte cellulari. **C.** STIM1 promuove l'apertura del canale CRAC, il quale permette l'ingresso del calcio extracellulare. La proteina Orai è una componente del canale CRAC. L'aumento dei livelli di calcio citosolici in associazione all'attivazione della PKC provoca l'attivazione di vari fattori trascrizionali e delle relative risposte cellulari.

L'IP3 è responsabile del rapido aumento della concentrazione citoplasmatica di Ca^{2+} che si osserva nei minuti successivi all'attivazione del linfocita T. L'IP3, generato a livello della membrana, diffonde nel citoplasma fino al reticolo endoplasmatico, dove si lega al proprio recettore, un canale del calcio regolato dal ligando, e stimola il rilascio del calcio immagazzinato in depositi contenuti all'interno di vescicole. Questo determina un rapido aumento (nell'arco di pochi minuti) della concentrazione di ioni calcio nel citoplasma, che passa dai valori basali di circa 100 nM fino a un picco di 600-1.000 nM. La deplezione di calcio nel reticolo endoplasmatico viene individuata da una proteina del reticolo stesso

detta STIM1 (*Stromal Interaction Molecule 1*), la quale attiva un canale ionico di membrana chiamato CRAC (*Calcium Release-Activated Calcium*) che, promuovendo l'ingresso di calcio extracellulare, permette di mantenere una concentrazione citosolica di 300-400 nM per più di un'ora. Un componente importante di questo canale è la proteina Orai; le mutazioni dei geni che codificano per questa proteina causano una rara immunodeficienza. Il Ca^{2+} citoplasmatico agisce da secondo messaggero legandosi a una proteina ubiquitaria calcio-dipendente detta *calmodulina*. Il complesso calcio-calmodulina attiva numerosi enzimi, tra cui una fosfatasi serina/treonina chiamata **calcineurina**, importante per l'attivazione di fattori trascrizionali (vedi più avanti).

Il DAG, il secondo prodotto dell'idrolisi di PIP2, attiva la proteina chinasi C (PKC), costituita da diverse isoforme che partecipano all'attivazione di fattori trascrizionali (vedi più avanti). La combinazione di elevato calcio citosolico e DAG attiva alcune isoforme della PKC di membrana inducendone un cambiamento conformazionale che rende il sito catalico accessibile ai suoi substrati. Molte proteine vengono fosforilate dalla PKC. L'isoforma θ della PKC si localizza a livello della sinapsi immunologica ed è coinvolta nell'attivazione e nella traslocazione al nucleo del fattore di trascrizione NF-κB (*Nuclear Factor κB*, fattore nucleare κB). Le vie di attivazione di NF-κB saranno discusse più avanti in questo capitolo.

Finora, abbiamo descritto molte vie di trasduzione del segnale che determinano l'attivazione di tipi diversi di enzimi nei linfociti T attivati dall'ingaggio del TCR: la via delle proteine G a basso peso molecolare e delle MAP chinasi che porta all'attivazione di ERK e JNK e una via della PLCγ1 che, attraverso l'aumento della concentrazione di calcio intracellulare, porta all'attivazione della fosfatasi calcineurina, mentre attraverso la generazione del DAG induce l'attivazione della PKC. Ciascuna di queste vie contribuisce all'espressione dei geni che codificano per le proteine necessarie per l'espansione clonale, la differenziazione e le funzioni effettrici dei linfociti T. Nel paragrafo successivo descriveremo i meccanismi attraverso cui queste diverse vie stimolano la trascrizione genica nei linfociti T.

Attivazione dei fattori di trascrizione che regolano l’espressione genica nei linfociti T

Gli enzimi generati a seguito della trasmissione del segnale da parte del TCR attivano fattori trascrizionali che si legano alle regioni regolatrici di numerosi geni determinandone un aumento della trascrizione (Fig. 7-16). Molte delle nostre conoscenze sui linfociti T si basano sullo studio della trascrizione dei geni delle citochine controllata dal legame dei fattori di trascrizione a sequenze nucleotidiche presenti nel promotore o nelle regioni enhancer. Per esempio, il promotore situato in posizione 5´ degli esoni del gene *IL-2* contiene un segmento di circa 300 paia di basi in cui sono localizzati i siti di legame per molti fattori di trascrizione. Per una trascrizione massimale del gene *IL-2*, tutti questi siti devono essere occupati dai rispettivi fattori. Le diverse vie di trasmissione del segnale attivano diversi fattori di trascrizione e questo spiega la necessità che l’attivazione del TCR sia associata all’induzione di molteplici vie di trasduzione del segnale. Gli stessi principi si applicano all’espressione di molti altri geni dei linfociti T, compresi quelli che codificano per i recettori per le citochine e per le molecole effettrici. È tuttavia possibile che geni diversi rispondano a differenti combinazioni di fattori di trascrizione.

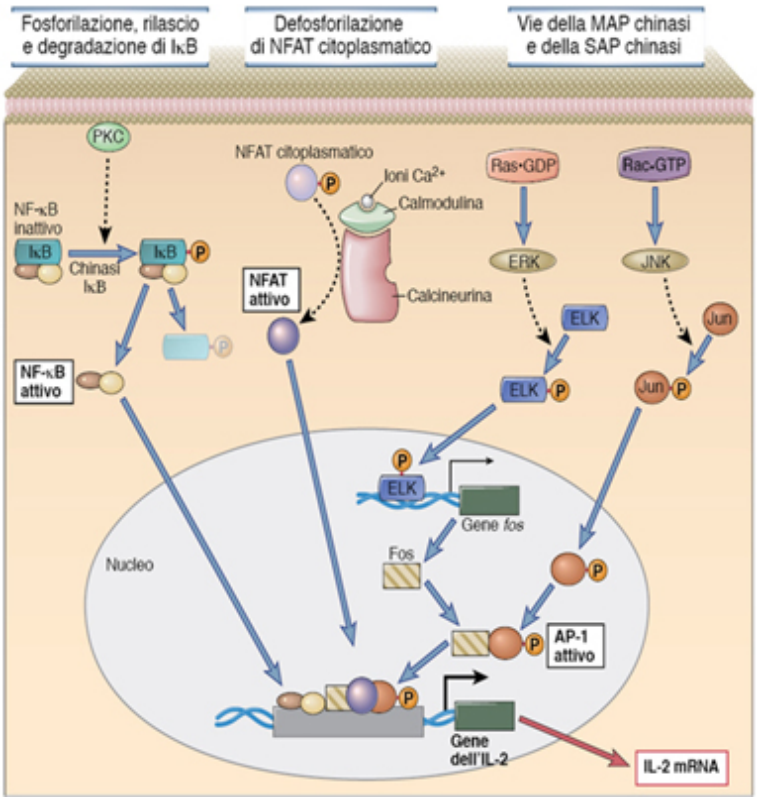


FIGURA 7-16 Attivazione dei fattori di trascrizione nei linfociti T. Più vie di trasduzione del segnale convergono nei linfociti T stimolati dall'antigene per generare fattori di trascrizione che stimolano l'espressione di vari geni (in questo caso, il gene dell'IL-2). La via calcio-calmodulina attiva NFAT e le vie di Ras e Rac generano i due componenti di AP-1. Meno nota è la correlazione tra i segnali del TCR e l'attivazione di NF-κB. (NF-κB è mostrato sotto forma di complesso a due subunità, che nei linfociti T sono in genere le proteine p50 e p65, il cui nome deriva dalle rispettive dimensioni in kilodalton.) La PKC è importante nell'attivazione dei linfociti T e la sua isoforma PCK-θ è particolarmente importante per l'attivazione di NF-κB. Questi fattori di trascrizione esplicano un'azione coordinata per regolare l'espressione genica. Si noti inoltre che, sebbene le varie vie di trasduzione del segnale siano mostrate come attivatrici di fattori di trascrizione specifici, è possibile una notevole sovrapposizione e ciascuna via può assumere un ruolo nell'attivazione di più fattori di trascrizione.

I fattori trascrizionali cruciali per la maggior parte delle risposte T sono tre: il fattore nucleare delle cellule T attivate (*Nuclear Factor of Activated T cells*, NFAT), AP-1 e NF-κB.

- **NFAT** è un fattore di trascrizione necessario per l'espressione dei geni che codificano per IL-2, IL-4 e TNF, oltre che per altre citochine. Esistono quattro tipi di NFAT, ognuno dei quali è codificato da geni diversi; *NFAT1* e *NFAT2* sono le forme espresse nei linfociti T. NFAT è presente nel citoplasma dei linfociti T quiescenti in una forma inattiva

fosforilata in serina e viene attivato dalla **calcineurina**, una fosfatasi calcio-calmodulina-dipendente che, defosforilando NFAT, rende disponibile un segnale di localizzazione nucleare che ne consente la traslocazione al nucleo. Una volta nel nucleo, NFAT si lega a sequenze consenso presenti nelle regioni regolatrici dei geni dell'*IL-2*, dell'*IL-4* e di altri geni delle citochine, solitamente in associazione ad altri fattori di trascrizione, come AP-1.

- **AP-1** è un fattore di trascrizione che si trova in molti tipi cellulari, ma viene attivato specificamente nei linfociti T da segnali trasmessi dal TCR. AP-1 è, di fatto, il nome di una famiglia di fattori che legano il DNA e che sono costituiti da dimeri composti da due proteine diverse legate tra loro grazie a un motivo strutturale comune detto *cerniera di leucina*. Il fattore AP-1 meglio caratterizzato è composto dalle proteine Fos e Jun. Nei linfociti T viene attivato a livello nucleare, per opera dei segnali trasmessi dal TCR. Come discusso precedentemente, la formazione di AP-1 attivo necessita della neosintesi della proteina Fos e della fosforilazione della proteina Jun già presente nel citosol, entrambe stimolate dalle chinasi MAP. AP-1 sembra associarsi fisicamente ad altri fattori trascrizionali presenti nel nucleo con cui funziona in modo sinergico. Pertanto, l'attivazione di AP-1 rappresenta un importante punto di convergenza delle vie di trasduzione del segnale innescate dal TCR.
- **NF-κB** è un fattore di trascrizione essenziale per la sintesi delle citochine che viene attivato in risposta a segnali trasmessi dal TCR. Le proteine NF-κB sono omo- o eterodimeri composti da proteine omologhe al prodotto di un protoncogene cellulare detto *c-rel*; questo fattore svolge un ruolo importante per la trascrizione di numerosi geni in differenti tipi cellulari e in particolare nelle cellule dell'immunità innata (vedi Cap. 4). L'attivazione del fattore NF-κB è importante anche nelle risposte innescate dai recettori Toll-like e di molte altre citochine e verrà discussa approfonditamente alla fine di questo capitolo.

Le interazioni tra le diverse proteine coinvolte nella trasduzione del segnale durante l'attivazione dei fattori di trascrizione e delle risposte dei linfociti T sono spesso difficili da definire a causa della loro complessità e delle

conoscenze ancora limitate. Inoltre, per semplicità, spesso si descrivono le vie di trasduzione del segnale come se fossero lineari, sebbene ciò potrebbe non riflettere esattamente quanto avviene in una realtà molto più complessa e interconnessa. Infine, pur essendoci focalizzati su alcune vie ben definite, ricordiamo che esistono molte altre molecole coinvolte nel processo di attivazione dei linfociti.

Un altro meccanismo attraverso il quale viene regolata l'attivazione dei linfociti T coinvolge i **microRNA** (**miRNA**), che sono piccoli RNA non codificanti trascritti dal DNA ma non tradotti in proteine. La funzione dei miRNA è di inibire l'espressione di geni specifici. Essi vengono inizialmente generati nel nucleo sotto forma di trascritti primari più lunghi che vengono processati da un'endoribinucleasi chiamata Drosha in pre-miRNA più corti dotati di una struttura stem-loop che possono essere esportati nel citosol. Qui, vengono processati da un'altra endoribonucleasi chiamata Dicer in miRNA corti a doppio filamento lunghi da 21 a 22 coppie di basi; uno dei due filamenti può essere usato per accoppiarsi a una sequenza complementare di svariati RNA messaggeri (mRNA) cellulari. Gli mRNA si associano con i miRNA e proteine chiamate Argonaute formando complessi noti come RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*, complesso silenziatore indotto da RNA). Se la sequenza di 6-8 coppie di basi del miRNA non è perfettamente complementare, la traduzione dell' mRNA è impedita. Nel caso la complementarietà sia perfetta, gli mRNA possono venire degradati. In ogni caso, ne deriva una riduzione del numero di proteine codificate da geni a cui miRNA si associano. Nei linfociti T attivati, l'espressione della maggior parte dei miRNA è globalmente ridotta. Inoltre, la proteina Argonauta viene ubiquitinata e degradata, compromettendo ulteriormente la funzione del miRNA e aumentando l'espressione di molte delle proteine necessarie per la progressione del ciclo cellulare a valle dell'attivazione dei linfociti T. miRNA specifici modulano l'espressione genica in diversi tipi di linfociti T, come verrà discusso nel Capitolo 8.

Modulazione della trasduzione del segnale dei linfociti T da parte di tirosine fosfatasi

Le tirosine fosfatasi rimuovono gruppi fosfato da residui di tirosina contenuti nelle proteine e in generale inibiscono la trasduzione del segnale

del TCR. SHP-1 e SHP-2 (*SH2-domain containing Phosphatases 1* e *2*) sono due esempi di tirosine fosfatasi che svolgono un importante ruolo inibitorio nei linfociti e in altre cellule ematopoietiche. Le fosfatasi inibitorie sono solitamente reclutate dagli ITIM presenti nelle code citoplasmatiche dei recettori inibitori che sono a loro volta fosforilati da tirosine chinasi indotte durante l'attivazione dei linfociti. Esse bloccano la trasduzione del segnale rimuovendo i gruppi fosfato dalle tirosine contenute in importanti molecole responsabili della trasduzione del segnale e si comportano quindi da antagonisti funzionali delle tirosine chinasi. Un'altra fosfatasi inibitoria che non agisce sulle fosfoproteine ma è invece specifica per un inositolfosfolipide è detta SHIP (*SH2 domain-containing Inositol Phosphatase*). Come SHP-1 e SHP-2, SHIP si lega a sequenze ITIM fosforilate presenti in specifici recettori inibitori. Rimuovendo un gruppo fosfato dal fosfatidilinositolo (3,4,5)-trifosfato (PIP3), fosfolipide del foglietto interno della membrana plasmatica, SHIP antagonizza la trasduzione del segnale dipendente dalla chinasi PI3.

La maggior parte delle fosfatasi hanno un ruolo inibitorio, tuttavia esiste una tirosina fosfatasi, detta CD45, che invece facilita l'attivazione dei linfociti T. CD45 è una tirosina fosfatasi recettoriale espressa da tutte le cellule ematopoietiche. Si tratta di una proteina integrale di membrana che, nella coda citoplasmatica, contiene domini tandem di tirosina fosfatasi. CD45 defosforila residui di tirosina inibitori delle chinasi della famiglia Src (incluse Lck e Fyn nei linfociti T) e contribuisce perciò a generarne le forme attive.

Trasduzione del segnale dei recettori costimolatori dei linfociti T

Alcuni recettori, riconoscendo i ligandi indotti sulle APC dai microbi, forniscono segnali costimolatori che cooperano con i segnali trasmessi dal TCR per promuovere l'attivazione dei linfociti T. La cosiddetta "ipotesi dei due segnali" necessari per l'attivazione dei linfociti T è stata introdotta nei Capitoli 1 e 4. Il segnale trasdotto dal TCR e dai corecettori in seguito al riconoscimento di un complesso MHC-peptide determina la risposta dei linfociti T nei confronti delle strutture estranee (non self) e, in gergo immunologico, viene detto "segnale 1"; tuttavia, perché l'attivazione dei linfociti T sia massimale, è necessario che il peptide estraneo sia già stato

riconosciuto e abbia attivato le risposte innate inducendo sulle APC i ligandi dei recettori costimolatori che rappresentano quindi un segnale di pericolo (o "segnale 2"). In sostanza, per ottenere un'attivazione massimale dei linfociti T verso un segnale non self deve combinarsi con la percezione di una situazione di pericolo.

Recettori costimolatori della famiglia del CD28

Le molecole costimolatorie meglio conosciute sono due proteine fra loro correlate, chiamate B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), espresse da cellule dendritiche attivate, macrofagi e linfociti B. La molecola CD28 dei linfociti T, che riconosce le proteine B7, è il principale recettore costimolatorio espresso dai linfociti T. Il ruolo biologico delle famiglie di proteine B7 e CD28 sarà discusso nel Capitolo 9.

Un altro membro attivatorio di questa famiglia è un recettore detto ICOS (*Inducible COStimulator*), importante per lo sviluppo dei linfociti T helper follicolari, che sarà discusso nei Capitoli 9 e 12.

Recettori costimolatori della famiglia CD2/SLAM

Concorrono all'attivazione e alla differenziazione dei linfociti T anche proteine che non appartengono alla famiglia CD28. Per esempio, una famiglia di proteine strutturalmente simili a un recettore chiamato CD2 è importante per l'attivazione sia dei linfociti T sia delle cellule NK. Il recettore CD2 è una glicoproteina espressa da oltre il 90% dei linfociti T maturi, dal 50-70% dei timociti e dalle cellule NK. La molecola contiene due domini Ig extracellulari, una regione idrofobica transmembrana e una lunga coda citoplasmatica costituita da 116 aminoacidi. Nell'uomo, il principale ligando di CD2 è costituito da una molecola chiamata LFA-3 (*Leukocyte Function-associated Antigen-3*) o CD58, anch'essa appartenente alla superfamiglia delle Ig. LFA-3 è espressa da un'ampia varietà di cellule ematopoietiche e non, sia come proteina integrale di membrana sia come molecola ancorata alla membrana mediante un ponte di fosfatidilinositolo. Nel topo, il principale ligando di CD2 è CD48, una proteina diversa ma strutturalmente simile a LFA-3 e comunque appartenente alla famiglia del CD2.

Il CD2 è un tipico esempio di molecola accessoria che funziona sia come molecola di adesione intercellulare sia come proteina in grado di trasdurre il segnale. Anche se la delezione genica di CD28, ma non di CD2, provoca difetti significativi della risposta immunitaria, la concomitante assenza sia di CD28 sia di CD2 causa difetti ancora più marcati di quelli dovuti alla mancanza del solo CD28. Questo indica che CD28 potrebbe compensare la perdita di CD2, un esempio della ridondanza del ruolo dei recettori costimolatori espressi dai linfociti T.

Un sottogruppo distinto di proteine della famiglia CD2 è conosciuto con il nome di **SLAM** (*Signaling Lymphocytic Activation Molecule*, molecola di trasduzione e attivazione linfocitaria). SLAM, come tutti i membri della famiglia CD2, è una proteina integrale di membrana che contiene due domini Ig extracellulari e una lunga coda citoplasmatica. La coda citoplasmatica di SLAM, ma non di CD2, contiene un motivo strutturale specifico caratterizzato dalla presenza di una tirosina, TxYxxV/I (dove T indica una treonina, Y una tirosina, V una valina, I una isoleucina e x un aminoacido qualunque), conosciuto come ITSM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif*), diverso dai motivi ITAM e ITIM che si trovano in altri recettori attivatori e inibitori. Esso viene chiamato *motivo interruttore* perché in alcuni recettori determina lo scambio tra il legame con la tirosina fosfatasi SHP-2 e il legame con una tirosina chinasi, come Fyn, a seconda dell'assenza o della presenza di un adattatore chiamato SAP (*SLAM Associated Protein*, proteina associata a SLAM). In questo modo, ITMS può mediare il passaggio da una funzione inibitoria a una attivatoria.

I domini Ig extracellulari di SLAM sono coinvolti nelle interazioni omofiliche: infatti una molecola SLAM espressa da un linfocita T può interagire con SLAM espressa da una cellula dendritica trasducendo un segnale al linfocita T. Il motivo ITSM lega la SAP che fa da ponte tra SLAM e Fyn (una chinasi della famiglia Src legata anche al CD3). SLAM e altri membri della famiglia funzionano come recettori costimolatori nelle cellule T, NK e in alcuni linfociti B. Come vedremo nel Capitolo 21, le mutazioni nel gene della SAP (*SH2D1A*) sono la causa della sindrome linfoproliferativa associata al cromosoma X (*X-Linked Lymphoproliferative syndrome*, XLP).

Un altro membro importante di questa famiglia è una molecola chiamata **2B4**, espressa dalle cellule NK, dai linfociti T CD8 e dalle cellule Tγδ.

Analogamente a SLAM, la coda citoplasmatica di 2B4 contiene motivi ITSM che legano la proteina adattatrice SAP e trasducono attraverso il reclutamento di Fyn. Difetti nella trasduzione del segnale di 2B4 concorrono a definire il quadro di deficit immunitario che si osserva nei pazienti con XLP.

Alterazioni metaboliche durante l'attivazione dei linfociti T

Quando i linfociti vengono attivati, la loro attività metabolica deve aumentare per soddisfare le maggiori richieste della risposta cellulare. Questo fenomeno è stato studiato soprattutto nei linfociti T. In seguito all'attivazione da parte di antigeni e molecole costimolatorie, i linfociti T aumentano il trasporto di glucosio e cambiano il meccanismo della produzione di energia passando dalla fosforilazione ossidativa mitocondriale alla glicolisi; questo avviene anche in presenza di grandi quantità di ossigeno, un fenomeno noto come glicolisi aerobica (Fig. 7-17). Questo fenomeno, noto anche come effetto Warburg, è stato descritto per la prima volta nelle cellule tumorali ma è ora riconosciuto come un importante meccanismo attivato durante la proliferazione di molti tipi cellulari. Anche se la glicolisi è un processo che genera meno ATP (che rappresenta la riserva energetica) rispetto alla fosforilazione ossidativa, la glicolisi usa come substrato solo il glucosio e quindi preserva gli aminoacidi e i lipidi per il le risposte dei linfociti attivati. Questo meccanismo alterato di produzione di energia può essere importante non solo per la proliferazione cellulare ma anche per la differenziazione dei linfociti T in cellule effettrici e per la produzione di citochine effettrici.

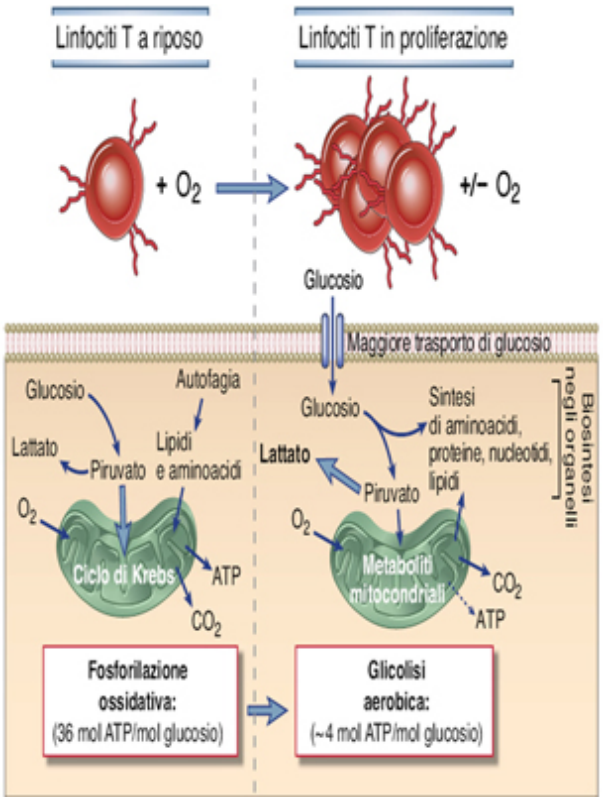


FIGURA 7-17 Alterazioni metaboliche durante l'attivazione dei linfociti T. Nei linfociti T a riposo, la principale via che genera energia è la fosforilazione ossidativa mitocondriale. Quando i linfociti vengono attivati, si verifica un passaggio alla glicolisi aerobica, che genera meno energia ma preserva e produce le basi per la biosintesi degli organelli cellulari, necessaria per la proliferazione e le risposte funzionali.

COMPLESSO RECETTORIALE DEI LINFOCITI B

Il recettore per l'antigene dei linfociti B (*B Cell Receptor*, BCR) è costituito da un anticorpo transmembrana associato a due catene responsabili della trasduzione del segnale. La struttura degli anticorpi è stata dettagliatamente descritta nel Capitolo 5. Ora ci concentreremo su alcune caratteristiche salienti delle forme di membrana e sulle proteine a esse associate e descriveremo in che modo trasducono il segnale ai linfociti B. Le vie di attivazione cellulare verranno qui riassunte senza entrare troppo nel dettaglio, poiché molto simili a quelle utilizzate dai linfociti T. È bene sottolineare tuttavia che, oltre alle somiglianze, fra i recettori per l'antigene

dei linfociti B e quelli dei linfociti T esistono anche importanti differenze (vedi Tab. 7-1).

Struttura del recettore per l'antigene dei linfociti B

Il recettore per l'antigene dei linfociti B naïve è rappresentato da IgM e IgD di membrana, sostituite da IgG, IgA o IgE nei linfociti B che hanno effettuato lo scambio di classe isotipica (vedi Cap. 12). Le Ig di membrana possiedono code citoplasmatiche composte da tre soli aminoacidi (lisina, valina, lisina), troppo corte per poter trasdurre il segnale generato dal riconoscimento dell'antigene. Di questo si occupano perciò altre due molecole dette Igα e Igβ, legate tra loro da un ponte disolfuro e associate in maniera non covalente all'Ig di membrana, insieme alla quale formano il **complesso del BCR** (Fig. 7-18). Entrambe queste catene possiedono un motivo ITAM intracitoplasmatico e, come il CD3 per il TCR, sono necessarie per il trasporto in membrana della molecola anticorpale.

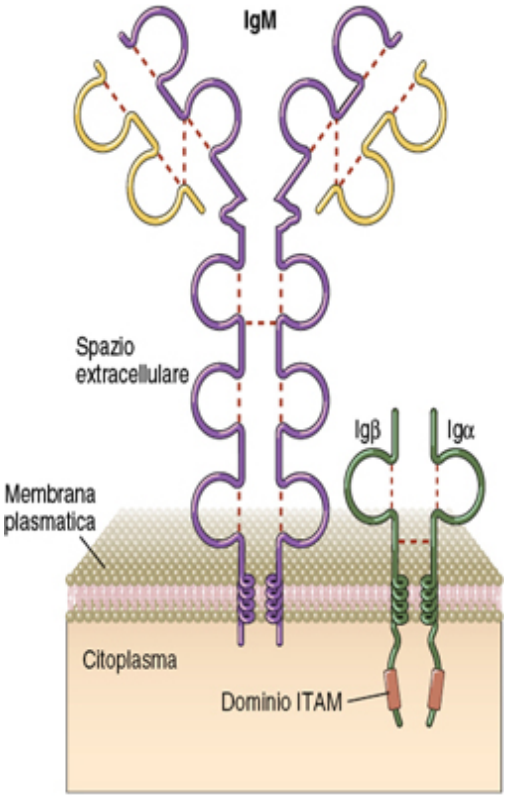


FIGURA 7-18 Complesso recettoriale per l’antigene dei linfociti B. Le IgM (e le IgD) espresse sulla superficie dei linfociti B maturi naïve sono associate alle molecole non polimorfe Igα e Igβ, che contengono nelle loro code citoplasmatiche le sequenze ITAM in grado di trasdurre il segnale. Si notino le somiglianze con il complesso recettoriale per l’antigene dei linfociti T (TCR).

Trasduzione del segnale da parte del recettore per l’antigene dei linfociti B

L’antigene innesca la trasduzione del segnale causando l’aggregazione del BCR. Inoltre, alcuni corecettori hanno il compito di facilitare l’attivazione cellulare. Si pensa che l’aggregazione delle Ig di membrana da parte di antigeni multivalenti comporti l’aggregazione anche di chinasi della famiglia Src e, promuovendone l’interazione fisica, la loro attivazione, rendendole capaci di fosforilare le tirosine degli ITAM di Igα e Igβ. È anche possibile che, come nei linfociti T, il legame dell’antigene determini un cambiamento conformazionale degli ITAM associati al BCR, rendendoli accessibili a chinasi della famiglia Src già attive. La fosforilazione delle tirosine degli ITAM attiva tutti gli eventi di trasduzione del segnale a valle del BCR (Fig. 7-19). Le Ig recettoriali aggregate entrano nei raft lipidici, dove si concentrano molte proteine adattatrici e molecole importanti per la trasduzione del segnale. Igα e Igβ sono debolmente associate a tirosine chinasi della famiglia Src come Lyn, Fyn e Blk, le quali sono anche associate al foglietto interno della membrana citoplasmatica mediante àncore lipidiche. I residui fosforilati di tirosina degli ITAM dell’Igα e dell’Igβ permettono il legame e l’attivazione della tirosina chinasi Syk, dotata di due domini SH2 in tandem. Questa può essere inoltre fosforilata e ulteriormente attivata dalle chinasi della famiglia Src associate al BCR. Se l’antigene è monovalente e quindi incapace di aggregare molti BCR, avviene comunque un minimo di trasduzione del segnale, ma per ottenere una completa attivazione del linfocita B è necessario l’intervento dei linfociti T helper, come verrà discusso nel Capitolo 12.

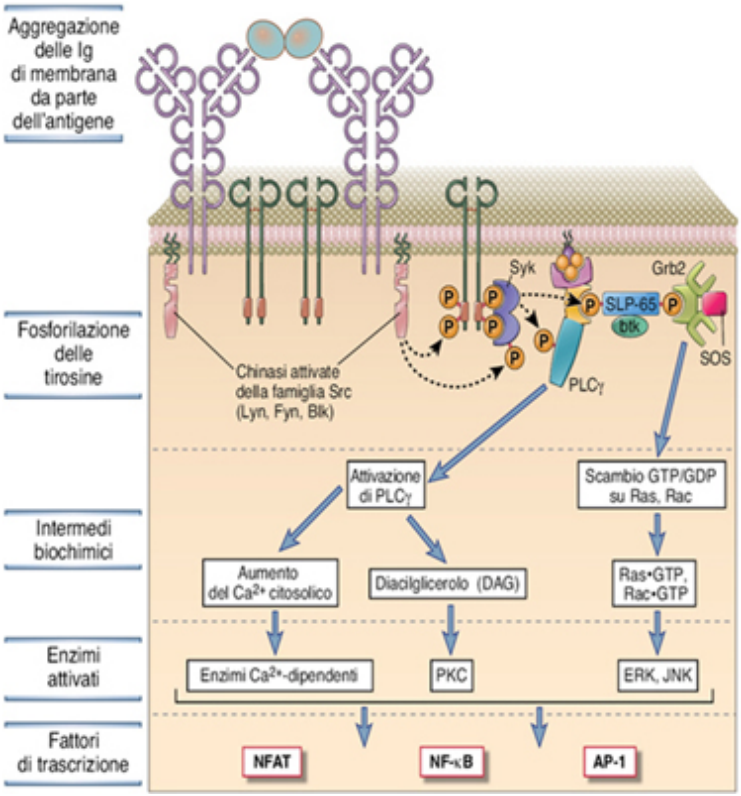


FIGURA 7-19 Trasduzione del segnale da parte del complesso BCR. Nei linfociti B, l'aggregazione delle Ig di membrana indotta dall'antigene determina l'aggregazione e l'attivazione delle tirosine chinasi della famiglia Src e la fosforilazione dei residui di tirosina delle sequenze ITAM presenti nelle code citoplasmatiche delle catene Igα e Igβ. A sua volta, ciò induce il reclutamento della chinasi Syk e i successivi eventi rappresentati in figura. Le cascate conseguenti determinano l'attivazione di diversi fattori di trascrizione. I meccanismi di trasduzione del segnale del BCR sono simili a quelli descritti per il TCR nei linfociti T.

Il recettore per il complemento CR2/CD21 funziona da corecettore per i linfociti B

L'attivazione dei linfociti B è potenziata dai segnali generati da proteine del complemento attraverso il recettore CD21, che fa dunque da tramite tra l'immunità innata e l'immunità specifica umorale (Fig. 7-20). Il sistema del complemento consiste di un gruppo di proteine plasmatiche che si attivano legandosi agli immunocomplessi (via classica) o interagendo direttamente con alcuni polisaccaridi o con le superfici microbiche in assenza di anticorpi (via alternativa e lectinica) (vedi Capp. 4 e 13). In questo modo, durante le risposte immunitarie innate i polisaccaridi e le sostanze di origine microbica possono attivare direttamente il sistema del complemento. Le proteine e altri antigeni che non attivano direttamente il

complemento possono legarsi ad anticorpi preesistenti o prodotti durante le prime fasi della risposta e questi immunocomplessi possono attivare il complemento attraverso la via classica. Ricordiamo qui che l'attivazione del complemento provoca la scissione proteolitica delle proteine che lo compongono. Il componente chiave di tutto il sistema è C3, dalla cui scissione si genera C3b che si lega covalentemente al microrganismo o all'immunocomplesso. C3b viene quindi ulteriormente degradato a formare C3d, che resta legato alla superficie microbica o al complesso antigene-anticorpo. I linfociti B esprimono un recettore per C3d denominato recettore per il complemento di tipo 2 (CR2 o CD21). Il complesso formato da C3d con l'antigene o con l'immunocomplesso si lega ai linfociti B, con il BCR che prende contatto diretto con l'antigene e il CR2 che invece riconosce la porzione di C3d (vedi Fig. 7-19).

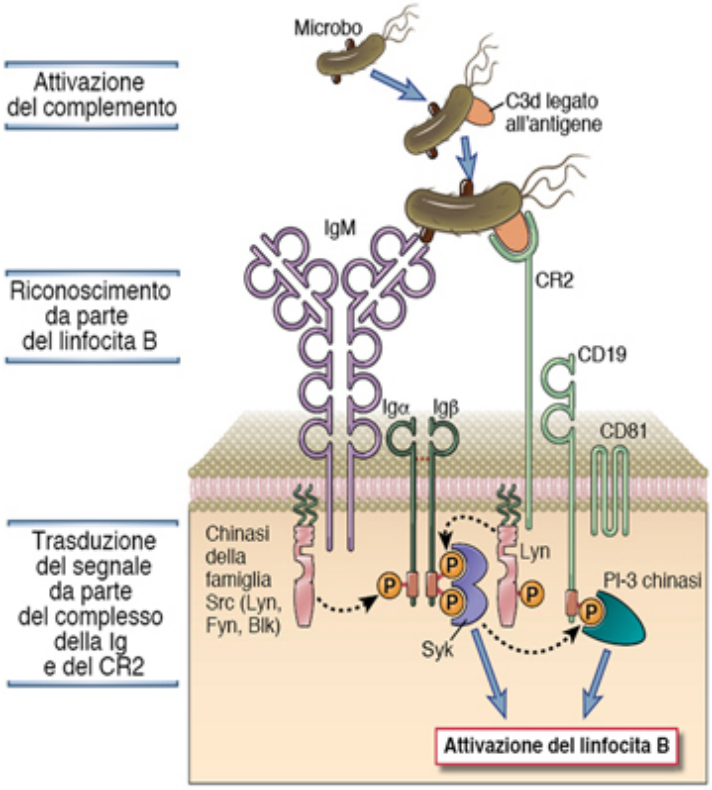


FIGURA 7-20 Ruolo del complemento nell'attivazione dei linfociti B. I linfociti B esprimono un complesso multirecettoriale composto dal recettore per il complemento CR2, da CD19 e da CD81. Gli antigeni microbici complessati con il frammento C3d del complemento possono interagire contemporaneamente sia con il CR2 sia con la Ig di membrana del complesso BCR. Ciò innesca la trasduzione del segnale da parte di entrambi i complessi recettoriali, cosicché la risposta ai complessi C3d-antigene risulta molto più potente rispetto alla risposta al solo antigene.

Il CR2 è espresso sulla membrana dei linfociti B come complesso trimolecolare con CD19 e CD81 (definito anche TAPA-1). Il complesso CR2-CD19-CD81 viene anche definito complesso corecettoriale dei linfociti *B* poiché il CR2, attraverso il C3d, lega l'antigene, che nello stesso momento è riconosciuto direttamente dalle Ig di membrana. Il legame di CR2 a C3d porta il CD19 (o per meglio dire la sua coda intracitoplasmatica) in prossimità delle chinasi associate al BCR. Di conseguenza, il CD19 viene rapidamente fosforilato causando il reclutamento della Lyn, una chinasi della famiglia Src in grado di amplificare i segnali generati dal BCR aumentando l'efficienza di fosforilazione dei residui di tirosina delle ITAM di Igα e Igβ. Il CD19 fosforilato è inoltre in grado di attivare altre vie di trasduzione del segnale tra le quali una dipende dalla chinasi PI3, anch'essa in grado di potenziare i segnali trasdotti dal legame dell'antigene al BCR. Infatti, la chinasi PI3 è necessaria per l'attivazione di Btk e PLC-γ2, in quanto questi enzimi devono legare PIP3 a livello della superficie interna della membrana plasmatica per poter essere completamente attivati, similmente a quanto mostrato per l'attivazione di PDK1 nei linfociti T nella Figura 7-12. Ne consegue che la risposta funzionale del linfocita B è notevolmente potenziata.

Vie di trasduzione del segnale a valle del recettore per l'antigene dei linfociti B

In seguito al legame del BCR con l'antigene, Syk e altre tirosine chinasi attivano numerosi secondi messaggeri "a valle", la cui attività viene regolata da numerose proteine adattatrici (vedi Fig. 7-19). L'aggregazione del BCR o la sua attivazione tramite un meccanismo dipendente dai corecettori determinano la fosforilazione degli ITAM e il reclutamento di Syk, seguito dall'attivazione di questa chinasi contenente due domini SH2. Una volta attivata, Syk causa la fosforilazione di specifici residui di tirosina della proteina adattatrice SLP-65 (*SH2-binding Leukocyte Phosphoprotein of 65 kD*), definita anche BLNK (*B Cell Linker Protein*). Ciò facilita il reclutamento di altri enzimi che contengono domini SH2 e domini PTB (*PhosphoTyrosine-Binding*), tra cui proteine scambiatrici di GTP/GDP che possono a loro volta attivare separatamente Ras e Rac, la fosfolipasi PLCγ2 e altre chinasi quali la tirosina chinasi Btk. Il reclutamento di tutte queste

molecole effettrici facilita la loro attivazione e ognuna di esse contribuisce all'attivazione di distinte vie di trasduzione del segnale.

- Nei linfociti B stimolati dall'antigene viene attivata la **via delle Ras-MAP chinasi**. Il fattore SOS è uno scambiatore di GTP/GDP che viene reclutato da BLNK attraverso il legame con la proteina adattatrice Grb-2; Ras viene poi convertita da questo scambiatore dalla forma inattiva legata al GDP alla forma attiva legata al GTP. Ras attivata contribuisce ad attivare la via di ERK precedentemente discussa nel contesto dell'attivazione dei linfociti T. Similmente, l'attivazione di Rac, una proteina G a basso peso molecolare, può contribuire ad attirare la via di JNK.
- In risposta al segnale trasdotto dal BCR viene attivata la **fosfolipasi C (*PhosphoLipase C*, PLC)** specifica per il fosfatidilinositolo che, a sua volta, attiva altri secondi messaggeri. Nei linfociti B, l'isoforma dominante della PLC è la γ2, mentre i linfociti T esprimono preferenzialmente l'isoforma γ1. PLC-γ2 si attiva quando si lega a BLNK e viene fosforilata da Syk e Btk. Come descritto per i linfociti T, PLC attivata taglia PIP2 generando IP3 solubile e liberando DAG nella membrana plasmatica. L'IP3 determina un rapido aumento della concentrazione di calcio intracitoplasmatico sia mobilizzandolo dai depositi intracellulari sia indirettamente, facendolo affluire dall'ambiente extracellulare. In presenza di elevate concentrazioni di calcio, il DAG attiva alcune isoforme della PKC (nei linfociti B, principalmente la PKC-β), che è a sua volta in grado di fosforilare i residui di serina/treonina di altre proteine.
- L'attivazione della **PKC-β** contribuisce all'attivazione di NF-κB nei linfociti B stimolati dall'antigene. Questo processo è simile a quello che, nei linfociti di T, è attivato dalla PKC-θ, l'isoforma caratteristica di queste cellule, mentre le vie di attivazione di NF-κB a valle delle PKC verranno descritte più avanti in questo capitolo.

Queste cascate di trasduzione del segnale finiscono per attivare diversi fattori di trascrizione necessari all'espressione di geni i cui prodotti sono indispensabili per l'attivazione dei linfociti B. Alcuni di questi sono: Fos (a valle di Ras e ERK), JunB (a valle di Rac e JNK) e NF-κB (a valle di Btk,

PLC-γ2 e PKC-β), già discussi precedentemente descrivendo le vie di attivazione dei linfociti T. Questi e altri fattori di trascrizione, molti dei quali non verranno qui menzionati, sono coinvolti nella stimolazione della proliferazione e della differenziazione dei linfociti B (vedi Cap. 12).

Come già discusso trattando i linfociti T, le nostre conoscenze relative alla trasduzione del segnale indotta dal riconoscimento dell'antigene nei linfociti B e ai meccanismi attraverso i quali vengono attivate le conseguenti risposte funzionali sono ampiamente incomplete. Qui abbiamo descritto alcuni di questi meccanismi a titolo esemplificativo, ma è molto probabile che altri possano svolgere un ruolo altrettanto importante nell'attivazione dei linfociti B. Da ultimo, sottolineiamo che le IgG, IgA e IgE di membrana dei linfociti B che hanno subito lo scambio di classe isotipica utilizzano le stesse vie di trasduzione del segnale descritte per le IgM e le IgD dei linfociti B naïve, dal momento che sembrano tutte associarsi a Igα e Igβ.

ATTENUAZIONE DELLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE DEI RECETTORI DEL SISTEMA IMMUNITARIO

L'attivazione linfocitaria deve essere attentamente controllata per evitare che la risposta contro i microbi arrechi danni collaterali ai tessuti dell'ospite. Inoltre, il sistema immunitario necessita di meccanismi in grado di prevenire la reazione contro gli antigeni self. Descriveremo la biologia di questi meccanismi di controllo in altri capitoli, in particolare nel Capitolo 15. L'attenuazione del segnale è fondamentale per prevenire l'infiammazione incontrollata e la linfoproliferazione. Qui discutiamo i meccanismi biochimici che limitano e pongono fine all'attivazione linfocitaria.

Nei linfociti, la trasduzione di segnali inibitori dipende anzitutto dall'attivazione di recettori inibitori, ma hanno un ruolo anche enzimi noti come ubiquitina ligasi E3, i quali contrassegnano determinate molecole affinché vengano degradate. Tipicamente, i recettori inibitori reclutano e attivano fosfatasi che contrastano gli eventi della trasduzione del segnale attivati dai recettori per gli antigeni (Fig. 7-21). Le risposte funzionali di qualunque cellula sono regolate dall'equilibrio fra segnali stimolatori e

inibitori. Qui descriveremo sommariamente il funzionamento dei recettori inibitori nelle cellule NK e nei linfociti T e B da un punto di vista meccanicistico; successivamente, descriveremo come le ubiquitina ligasi E3 possano attenuare l'attivazione linfocitaria. La rilevanza biologica dell'effetto dei recettori inibitori nelle cellule NK e nei linfociti T e B viene affrontata rispettivamente nei Capitoli 4, 9 e 12.

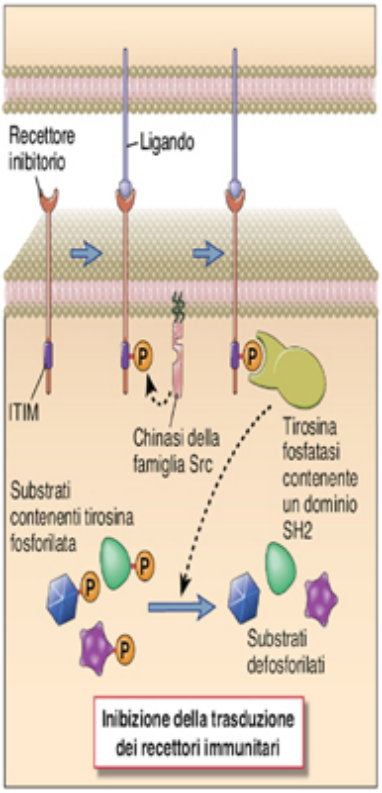


FIGURA 7-21 Trasduzione del segnale inibitoria nei linfociti. La figura rappresenta l'immagine schematica di un recettore inibitorio dotato di dominio di riconoscimento del ligando extracellulare e motivo ITIM citosolico. Il riconoscimento del ligando determina la fosforilazione, da parte di una chinasi della famiglia Src, della tirosina contenuta nell'ITIM, seguita dal reclutamento di una tirosina fosfatasi contenente domini SH2, la quale contrasta la trasduzione del segnale del recettore immunitario.

Recettori inibitori delle cellule NK e dei linfociti B e T

La maggior parte dei recettori inibitori del sistema immunitario contiene motivi ITIM nelle code citoplasmatiche, che possono reclutare fosfatasi contenenti domini SH2 e in questo modo attenuare la trasduzione del segnale (vedi Fig. 7-21). I recettori inibitori svolgono un ruolo fondamentale nelle cellule NK, nei linfociti T e B e nelle cellule dell'immunità innata.

Nelle cellule NK, i recettori inibitori chiamati KIR (vedi Cap. 4) contengono domini extracellulari Ig che possono riconoscere molecole HLA di classe I; una frazione di questi recettori contiene motivi ITIM citosolici. Il recettore inibitorio CD94/NKG2A, che riconosce una molecola MHC di classe I atipica nota come HLA-E, possiede motivi ITIM citosolici.

I residui di tirosina presenti negli ITIM di questi e altri recettori inibitori possono essere fosforilati da chinasi della famiglia Src connesse all'attivazione linfocitaria e, come descritto in precedenza, reclutare tirosine fosfatasi contenenti domini SH2 (quali per esempio SHP-1 e SHP-2) e una inositolo fosfatasi contenente domini SH2, SHIP. Le tirosine fosfatasi SHP-1 e SHP-2 attenuano la trasduzione del segnale attivata dalla fosforilazione in tirosina a opera dei recettori attivatori delle cellule NK e del BCR e del TCR nei linfociti B e T. Invece, SHIP rimuove i gruppi fosfato da PIP3, inibendo così l'attività della chinasi PI3 nei linfociti, nelle cellule NK e nelle cellule dell'immunità innata.

CTLA-4 (anche noto come CD152) è il più noto recettore inibitorio della famiglia di CD28 e possiede la capacità di inibire le risposte dei linfociti attivati. È importante sottolineare che CTLA-4 possiede un'affinità per le proteine B7 superiore rispetto a quella del CD28. CTLA-4 è responsabile del mantenimento della tolleranza (ovvero della "non risposta") agli antigeni self e il suo ruolo sarà discusso proprio all'interno di tale contesto nel Capitolo 15. Un altro recettore inibitorio appartenente alla stessa famiglia e parimenti presentato nel Capitolo 15 è **PD-1** (*Programmed Death 1*). CTLA-4 presenta nella propria coda un motivo contenente tirosina che potrebbe avere funzioni inibitorie; PD-1 contiene motivi ITIM e ITSM citosolici e si sa che la sua coda citoplasmatica è fondamentale per l'attivazione dei segnali inibitori. I principali recettori inibitori nei linfociti B sono FcγRIIB e CD22/Siglec-2 (vedi Cap. 12). Il recettore FcγRIIB, importante non solo nei linfociti B attivati ma anche nelle cellule dendritiche e nei macrofagi, può legare immunocomplessi contenenti IgG attraverso i suoi domini immunoglobulinici extracellulari. Fondamentalmente esso recluta SHIP, antagonizzando i segnali che derivano dalla chinasi PI3. Questo recettore spegne l'attivazione dei linfociti B nella fase terminale della risposta umorale e verrà discusso dettagliatamente nel Capitolo 12.

Ruolo delle ubiquitina ligasi E3 nella degradazione delle proteine della trasduzione del segnale

Uno dei principali meccanismi di degradazione delle proteine citoplasmatiche e nucleari si basa sul loro legame covalente a residui di ubiquitina. Nonostante l'ubiquitinazione sia frequentemente associata alla degradazione nel proteasoma, le proteine possono subire diversi tipi di ubiquitinazione, ognuno dei quali dotato di diverso significato funzionale. Tipi diversi di ubiquitinazione possono causare l'attenuazione o l'induzione della trasduzione del segnale.

Il processo di ubiquitinazione è stato brevemente discusso nel Capitolo 6 nel contesto della processazione degli antigeni su MHC di classe I. L'ubiquitina è una proteina di 76 aminoacidi attivata in maniera ATP-dipendente da un enzima E1 per essere poi trasportata da un enzima E2 su uno specifico substrato che viene riconosciuto dall'ubiquitina ligasi E3. Molto spesso, dopo che la porzione C-terminale di un'ubiquitina è stata unita covalentemente a un residuo di lisina della proteina bersaglio, le estremità C-terminali delle successive ubiquitine vengono legate a residui di lisina dell'ubiquitina precedente, così da generare catene di poliubiquitina. La forma della catena di poliubiquitina varia notevolmente a seconda dello specifico residuo di lisina utilizzato per il legame della molecola successiva e ha importanti conseguenze funzionali. Se la lisina-48 della prima ubiquitina forma un legame isopeptidico con il C-terminale dell'ubiquitina successiva e così via, verrà generata una catena di tipo lisina-48 che può essere riconosciuta dal proteasoma: in questo modo, la proteina risulta contrassegnata per la degradazione nel proteasoma. Alcune ligasi E3 generano un tipo differente di catena, detto *lisina-63*, la quale, invece di contrassegnare le proteine per la degradazione, dà vita a una struttura che aggancia la proteina ad altre proteine specifiche; ciò è importante per l'attivazione di NF-κB, come sarà discusso più avanti. Per alcune funzioni, in particolare per inviare proteine di membrana ai lisosomi anziché al proteasoma, è possibile che alla proteina in questione venga attaccata una singola ubiquitina.

Nei linfociti T esistono diverse ligasi E3, alcune sono coinvolte nell'attivazione e altre nell'inibizione della trasduzione del segnale. Una tipica ligasi E3 coinvolta nello spegnimento delle risposte è Cbl-b, ma molte

altre svolgono funzioni simili. Il reclutamento della ligasi Cbl-b al complesso del TCR e alle proteine adattatrici a esso associate determina la monoubiquitinazione, l'endocitosi e la degradazione lisosomiale del complesso stesso e questo potrebbe rappresentare un meccanismo di inibizione della trasduzione del segnale del TCR (Fig. 7-22). I segnali provenienti dal CD28 bloccano invece l'attività inibitoria di Cbl-b e questo è uno dei modi attraverso cui la costimolazione aumenta l'attivazione da parte del TCR. Nei topi geneticamente modificati che non esprimono Cbl-b, i linfociti T rispondono all'antigene anche in assenza della costimolazione da parte del CD28 e producono quantità sproporzionate di IL-2. Questi topi vanno incontro a fenomeni di autoimmunità dovuta all'aumentata attivazione dei linfociti T.

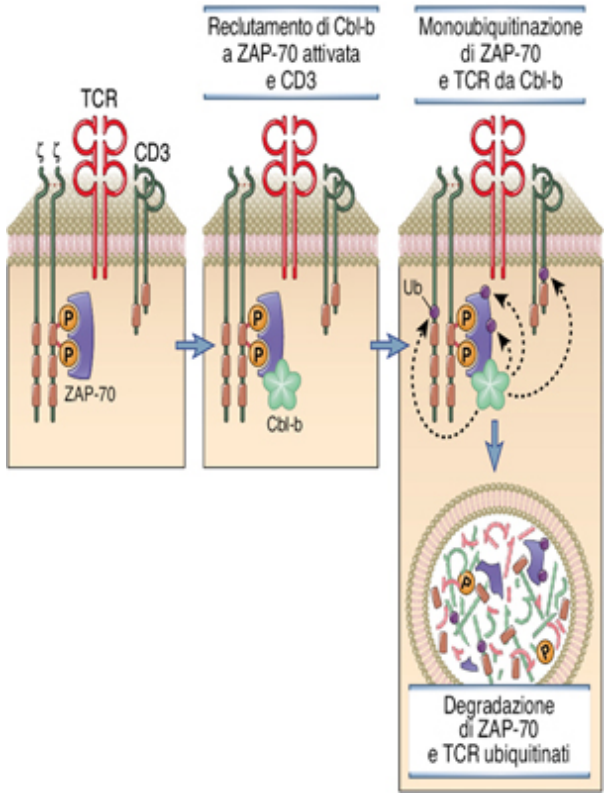


FIGURA 7-22 Ruolo dell'ubiquitina ligasi Cbl-b nello spegnimento della risposta T. Cbl-b viene reclutata al complesso del TCR, dove promuove la monoubiquitinazione di CD3, ZAP-70 e altre proteine del complesso del TCR. Queste proteine vengono poi destinate alla degradazione proteolitica nei lisosomi e in altri organuli intracellulari (non mostrati in figura).

RECETTORI PER LE CITOCHINE E TRASDUZIONE DEL SEGNALE

Le citochine, i messaggeri proteici del sistema immunitario, sono state trattate nei capitoli precedenti e lo saranno per tutto il libro. Qui descriveremo i recettori per le citochine e i relativi meccanismi di trasduzione del segnale.

Tutti i recettori per le citochine sono costituiti da una o più proteine transmembrana le cui porzioni extracellulari legano la citochina, mentre le porzioni citoplasmatiche trasducono il segnale all'interno della cellula. Nella maggior parte dei casi, la trasduzione del segnale viene attivata dall'aggregazione di più recettori a opera del ligando, grazie alla quale le code intracitoplasmatiche vengono portate a stretto contatto rendendo così possibile l'attivazione di specifiche tirosine chinasi non recettoriali. I recettori che appartengono alla famiglia del recettore per il TNF rappresentano un'eccezione: infatti sono dei trimeri preformati che, dopo aver riconosciuto i rispettivi ligandi, anch'essi trimerici, vanno incontro a un cambiamento conformazionale che attiva la trasduzione del segnale.

Classi di recettori per le citochine

Il metodo più utilizzato per classificare i recettori per le citochine si basa sull'omologia strutturale dei domini extracellulari (responsabili del riconoscimento della citochina) e sull'utilizzazione di meccanismi comuni di trasduzione (Fig. 7-23). I meccanismi di trasduzione del segnale utilizzati dalle singole famiglie di recettori sono esaminati nella sezione seguente.

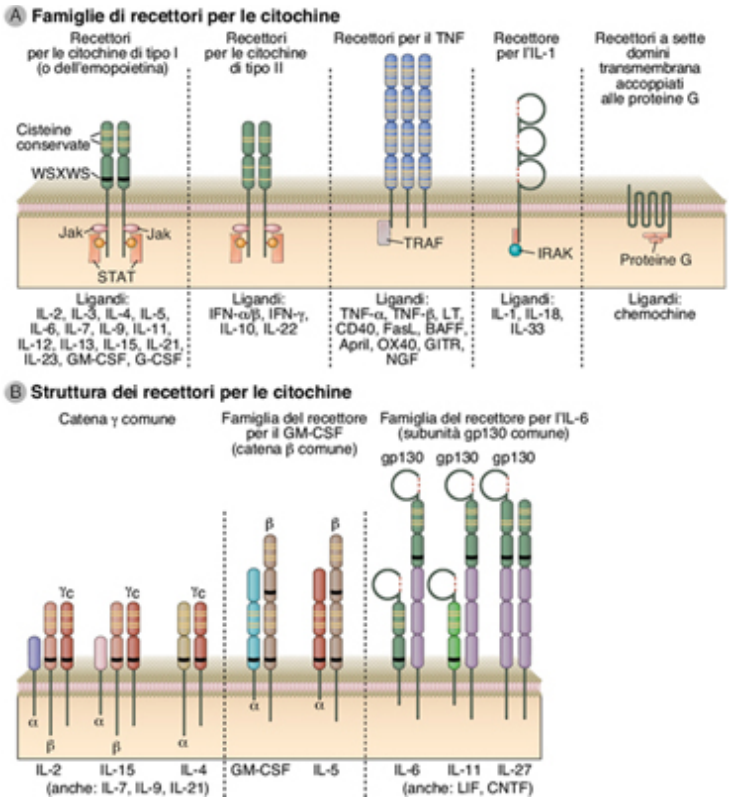


FIGURA 7-23 Struttura dei recettori per le citochine. A. I recettori per le diverse citochine sono classificati in famiglie sulla base dei domini strutturali extracellulari conservati e dei meccanismi di trasduzione del segnale. Le citochine e gli altri ligandi riconosciuti da ciascuna famiglia sono elencati sotto le rappresentazioni schematiche. WSXWS, triptofano-serina-x-triptofano-serina. **B.** Gruppi di recettori per citochine condividono catene identiche o altamente omologhe. Per ciascun gruppo sono mostrati alcuni recettori selezionati. NGF (*Nerve Grow Factor*), fattore di crescita della cellula nervosa

Recettori per le citochine di tipo I (famiglia del recettore dell'ematopoietina)

I recettori per le citochine di tipo I sono dimeri o trimeri composti da catene, specifiche per ciascun recettore, che hanno il compito di riconoscere il ligando e da una o più catene che trasducono il segnale, spesso condivise da molti recettori. Entrambi i tipi di catena sono caratterizzati da uno o due domini conservati contenenti un paio di residui di cisteina e dalla sequenza aminoacidica triptofano-serina-X-triptofano-serina (WSXWS), dove X sta per un aminoacido qualsiasi), posta in prossimità della membrana cellulare (Fig. 7-23, *A*). Le sequenze conservate formano strutture tridimensionali in grado di legare citochine contenenti quattro α-eliche, dette *citochine di tipo I*. La specificità per una determinata citochina è tuttavia conferita da

aminoacidi caratteristici di ciascun recettore. Questa famiglia recettoriale può essere divisa in sottogruppi basati su omologie strutturali o sull'uso condiviso di catene che trasducono il segnale (vedi Fig. 7-23, *B*). Un primo sottogruppo è caratterizzato dall'impiego di una catena denominata *catena* γ *comune* (CD132) e comprende i recettori per l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 e l'IL-21. Un secondo sottogruppo, che utilizza invece una catena β comune (CD131), include i recettori per l'IL-3, l'IL-5 e il GM-CSF. Un ulteriore sottogruppo utilizza la catena gp130 e include i recettori per l'IL-6, l'IL-11 e l'IL-27. Tutti i recettori per le citochine di tipo I ingaggiano una via di trasduzione di tipo JAK-STAT.

Recettori per le citochine di tipo II (famiglia del recettore dell'interferone)

I recettori di tipo II, come quelli di tipo I, possiedono due domini extracellulari contenenti residui conservati di cisteina, ma mancano del motivo WSXWS. Questi recettori sono composti da una catena che riconosce la citochina e da una che trasduce il segnale. Anche questa famiglia, che include i recettori per gli interferoni di tipo I e II, per l'IL-10, l'IL-20 e l'IL-22, ingaggia vie di trasduzione di tipo JAK-STAT.

Famiglia del recettore per il TNF

Come precedentemente accennato, questi recettori sono costituiti da trimeri preformati. Essi appartengono a una più ampia famiglia, che comprende anche recettori che riconoscono ligandi associati alla membrana e che in questo caso non sono considerati recettori per citochine, caratterizzati da domini extracellulari conservati ricchi di cisteina e dall'utilizzo di meccanismi di trasduzione comuni. Questi meccanismi normalmente stimolano l'espressione genica, ma in alcuni casi possono indurre apoptosi. Alcuni importanti membri di questa famiglia sono i due recettori per il TNF (TNFRI e TNFRII), la proteina CD40, la proteina Fas, il recettore per la linfotossina e la famiglia dei recettori del fattore di attivazione della cellula B (*B cell Activating Factor*, BAFF), molti dei quali verranno discussi nei rispettivi contesti biologici in altri capitoli. Anche i ligandi di questi recettori sono trimeri, solubili oppure di membrana.

I recettori trimerici che riconoscono i rispettivi ligandi subiscono un cambiamento conformazionale che permette loro di reclutare proteine

adattatrici, le quali a loro volta reclutano proteine chinasi che iniziano la trasduzione del segnale a valle dei ricettori. Viene inoltre reclutata l'ubiquitina ligasi E3, enzima responsabile di una poliubiquitinazione non degradativa. Nel caso del recettore per il TNF, illustrato nella Figura 7-24, viene reclutata la proteina adattatrice TRADD *(TNF Receptor-Associated Death Domain*), che a sua volta può reclutare proteine dette TRAF (*TNF Receptor-Associated Factors*) dotate di specifica attività ligasi E3, che sarà discussa nel paragrafo dedicato a NF-κB. Il recettore per il TNF di tipo I e la proteina Fas (CD95) possono anche reclutare adattatori che causano l'attivazione della caspasi-8 e quindi, in certi tipi cellulari, indurre l'apoptosi.

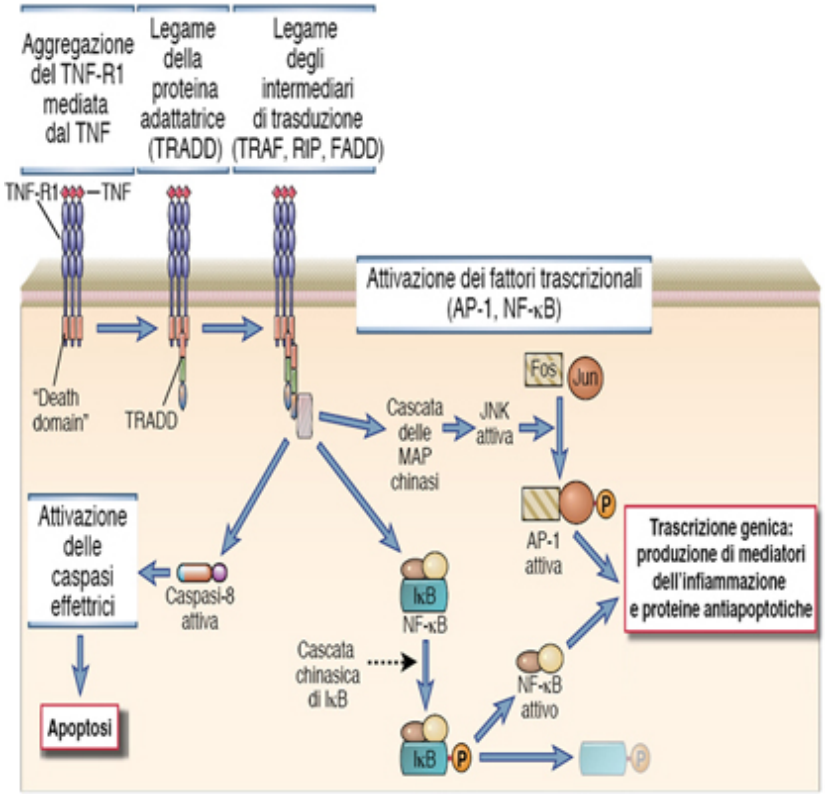


FIGURA 7-24 La trasduzione del segnale del recettore per il TNF può portare all'attivazione di NF-κB e delle MAP chinasi oppure alla morte per apoptosi. L'attivazione del recettore per il TNF di tipo I determina il reclutamento di una proteina adattatrice chiamata TRADD, la quale a sua volta attiva le molecole TRAF (ubiquitina ligasi E3) e la chinasi RIP1. Come conseguenza, si ottiene a valle l'attivazione delle vie di NF-κB e della MAP chinasi JNK, oppure l'induzione della morte per apoptosi. TRAF = TNF (*Receptor-Associated Factor*), fattore associato al recettore per il TNF

Famiglia dell'IL-1

I recettori di questa famiglia possiedono un dominio citoplasmatico conservato detto TIR (*Toll-like/IL-1 Receptor*) mediante il quale ingaggiano vie di trasduzione che attivano la trascrizione genica. La via utilizzata dai TLR è stata già discussa nel Capitolo 4, al quale si rimanda. Brevemente, l'ingaggio degli IL-1R o dei TLR determina la dimerizzazione del recettore e il reclutamento, in corrispondenza del dominio TIR, di una o più proteine adattatrici contenenti anch'esse un dominio TIR (ne sono stati finora descritti quattro). Le proteine adattatrici collegano i recettori a differenti membri della famiglia degli IRAK (*IL-1R-Associated Kinase*). Gli IRAK a loro volta possono mettere in contatto le proteine adattatrici alla proteina TRAF6, una ubiquitina ligasi E3 necessaria per l'attivazione di NF-κB. Altri eventi a valle della trasduzione del segnale dei TLR includono l'attivazione della chinasi MAP e la fosforilazione di IRF3 e IRF7, responsabili della trascrizione dell'interferone di tipo I. Quest'ultimo aspetto della trasduzione del segnale dei TLR è stato esaminato nel contesto dello stato antivirale descritto nel Capitolo 4. Diverse molecole adattatrici collegano i TLR alla trasduzione del segnale da parte di NF-κB, all'attivazione delle chinasi MAP, all'attivazione tardiva di NF-κB e all'attivazione di IRF3. I meccanismi che, partendo da IL-1R/TLR, portano all'attivazione di NF-κB verranno descritti più avanti.

Trasduzione del segnale tramite JAK e STAT

I membri della famiglia dei recettori per le citochine di tipo I e II attivano vie di trasduzione che coinvolgono enzimi definiti chinasi Janus (JAK) e fattori di trascrizione definiti STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*). La via JAK/STAT venne scoperta studiando la trasduzione del segnale degli interferoni. Al momento, sono stati identificati quattro chinasi Janus (JAK da 1 a 3 e TYK2) e sette proteine STAT (STAT da 1 a 4, 5a, 5b, e 6).

La sequenza di eventi che si susseguono nel corso dell'attivazione delle vie JAK/STAT è ora ben caratterizzata (Fig. 7-25). Le forme inattive delle chinasi JAK sono associate non covalentemente ai domini citoplasmatici dei recettori per le citochine di tipo I e II. L'aggregazione di due catene recettoriali causata dal legame della citochina determina l'attivazione delle molecole JAK associate al recettore, che fosforilano residui di tirosina

presenti nella porzione citoplasmatica del recettore. Alcuni dei residui di fosfotirosina vengono quindi riconosciuti e legati da domini SH2 presenti nelle proteine STAT, che si trovano nel citoplasma in forma monomerica. Le proteine STAT vengono così avvicinate e fosforilate dalle JAK associate al recettore. I residui di fosfotirosine della STAT attivata sono in grado di legare il dominio SH2 di un'altra molecola STAT, formando un dimero che si stacca dal recettore e trasloca al nucleo, dove si lega a sequenze di DNA specifiche, presenti nelle regioni promotrici dei geni responsivi alle citochine, attivandone la trascrizione.

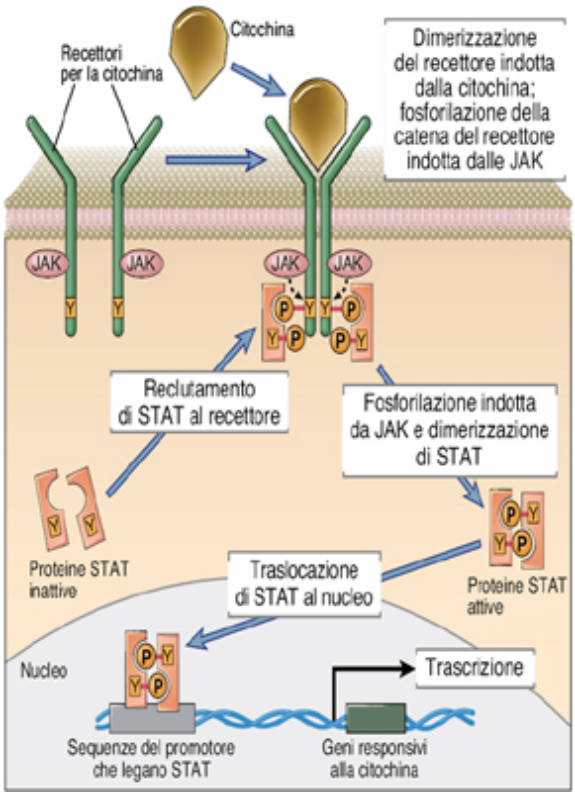


FIGURA 7-25 Trasduzione del segnale tramite JAK-STAT. Il riconoscimento del ligando da parte dei recettori per le citochine di tipo I e II determina l'attivazione di JAK (una tirosina chinasi associata al recettore), la fosforilazione della coda del recettore e il reclutamento di un attivatore della trascrizione contenente domini SH2 (STAT). Dopo essere stato reclutato, il fattore di trascrizione STAT viene fosforilato e attivato dalla molecola JAK, dimerizza, entra nel nucleo e attiva l'espressione dei geni responsivi alla citochina.

Un'importante domanda sollevata dagli eventi descritti riguarda la specificità delle risposte alle molte citochine esistenti a fronte del limitato numero di JAK e STAT. Con buona probabilità, la risposta sta nella capacità

di attivare diverse combinazioni di JAK e STAT, dovuta alla presenza in ciascun recettore di sequenze aminoacidiche specifiche. Infatti, i diversi domini SH2 presenti nelle proteine STAT riconoscono selettivamente strutture costituite sia dai residui di fosfotirosina sia dalle sequenze aminoacidiche adiacenti. Ciò sembrerebbe essere il principale meccanismo attraverso cui diversi recettori per le citochine, che attivano particolari STAT, inducono specifiche attività biologiche. Molti recettori di tipo I e II sono dimeri formati da due diverse catene, ognuna delle quali è in grado di legare una JAK diversa. Inoltre, due diverse STAT fosforilate possono formare eterodimeri. Ne consegue che, pur essendo limitato il numero di JAK e STAT, il numero delle combinazioni possibili è in realtà molto maggiore.

Nell'uomo diverse JAK e STAT sono coinvolte in malattie e rappresentano bersagli di agenti terapeutici. Tutta la classe delle citochine di tipo I che usa la catena comune γ (CD132; vedi Fig. 7-23, *B*) usa la chinasi JAK3 per la trasduzione del segnale. JAK3 è l'unico membro di questa famiglia a non essere espressa in modo ubiquitario; la sua espressione è infatti ristretta alle cellule del sistema immunitario ed è attivata solo dai recettori per le citochine che utilizzano la catena comune γ. Come discusso nel Capitolo 12, la catena comune γ è codificata da un gene collocato sul cromosoma X e le mutazioni di questo gene sono responsabili dell'immunodeficienza severa e combinata grave legata al cromosoma X (X-SCID). Le mutazioni autosomiche recessive del gene che codifica per JAK3 contribuiscono a un fenotipo simile. I recettori per le citochine di tipo I della famiglia di IL-6 (vedi Fig. 7-23, *B*) usano JAK2 per attivare STAT3. Anche diverse altre citochine attivano STAT3. Come discusso nei Capitoli 4 e 10, la trasduzione del segnale di IL-6 contribuisce all'infiammazione sia nel contesto dell'immunità innata sia della generazione di risposte T_H17. Le mutazioni eterozigoti dominanti negative di STAT3 sono tra le cause della sindrome da iper IgE, chiamata anche sindrome di Giobbe, un'immunodeficienza associata a difetti delle risposte T_H17 (vedi Cap. 21). Le mutazioni che determinano l'attivazione di STAT3 sono caratteristiche delle leucemie dei grandi linfociti granulari che coinvolgono l'espansione di cellule NK o di linfociti T $CD8^+$. In generale, le mutazioni della linea germinale che determinano la perdita di funzione in alcune JAK e STAT contribuiscono a sindromi da immunodeficienza primaria e le mutazioni

somatiche attivatorie delle STAT sono associate a una moltitudine di neoplasie. Sono stati sviluppati antagonisti delle JAK per il trattamento di alcune leucemie che presentano mutazioni in questa via e, più recentemente, per il trattamento di malattie infiammatorie tra cui l'artrite reumatoide.

Oltre a JAK e STAT, le citochine attivano anche altre vie di trasduzione del segnale e fattori di trascrizione. Per esempio, la catena β del recettore per l'IL-2 attiva le vie RAS/MAPK che possono stimolare la proliferazione cellulare e la trascrizione genica. È quindi possibile che i recettori per le citochine attivino le vie JAK/STAT in combinazione con altre vie di trasduzione, determinando così la specificità delle risposte biologiche.

Sono stati descritti diversi meccanismi di regolazione negativa delle vie JAK/STAT. Per esempio, le proteine SOCS (*Suppressors Of Cytokine Signaling*), identificate grazie alla presenza di un dominio SH2 e di una regione C-terminale conservata di 40 aminoacidi chiamata SOCS box, fungono da adattatori per l'attività di una ligasi E3 composta da molte sottounità. Il legame alle STAT e alle JAK attivate determina l'ubiquitinazione e la degradazione da parte del proteasoma grazie alle ligasi E3 a esse strettamente associate. I livelli delle proteine SOCS possono essere regolati dai ligandi dei TLR, dalle citochine stesse e da altri stimoli. In questo modo, le proteine SOCS agiscono da regolatori a feedback negativo della stimolazione cellulare da parte delle citochine. Altri inibitori della via JAK/STAT sono le tirosine fosfatasi, quali SHP-1 e 2, che inattivano le JAK mediante defosforilazione. Un'altra famiglia di proteine, chiamate inibitori di STAT (*Protein Inhibitors of Activated STAT*, PIAS), si lega alle STAT fosforilate e impedisce la loro interazione con il DNA. Oggi si sa che le proteine PIAS legano e inibiscono anche altri fattori di trascrizione attivati dai recettori per le citochine come IRF, NF-κB e particolari fattori trascrizionali a valle dei recettori appartenenti alla famiglia del TGF-β noti come SMAD (*Small Mother Against Decapentaplegic*).

Vie di attivazione di NF-κB

NF-κB è un fattore trascrizionale fondamentale per l'infiammazione, l'attivazione linfocitaria, la sopravvivenza cellulare e la formazione degli organi linfoidi secondari. È inoltre importante per lo sviluppo dei linfociti e nella patogenesi di diversi tipi di tumori, come per esempio alcune neoplasie

maligne che derivano da linfociti attivati. NF-κB viene attivato, oltre che dal riconoscimento dell'antigene, da molte citochine e ligandi dei TLR e verrà qui presentato quale prototipo di fattore trascrizionale fondamentale nelle risposte immunitarie innate e adattative.

Il termine NF-κB indica in realtà una famiglia composta da cinque proteine che presentano un dominio comune, detto dominio di omologia Rel, in grado di legare il DNA. Per essere attivo, un fattore trascrizionale deve tuttavia essere in grado non solo di legarsi al DNA ma anche di attivare la trascrizione attraverso un apposito "dominio di attivazione". Tre proteine NF-κB possiedono sia domini di omologia Rel sia domini di attivazione: p65/RelA, RelB e c-Rel. Al contrario, NF-κB1/p50 e NF-κB2/p52 mancano dei domini di attivazione. NF-κB1 forma eterodimeri attivi, detti "canonici", con p65/RelA o c-Rel (Fig. 7-26). Essi risiedono nel citoplasma legati a un inibitore chiamato **IκBα** e vengono attivati da numerosi recettori coinvolti nell'induzione dell'infiammazione e nell'attivazione linfocitaria.

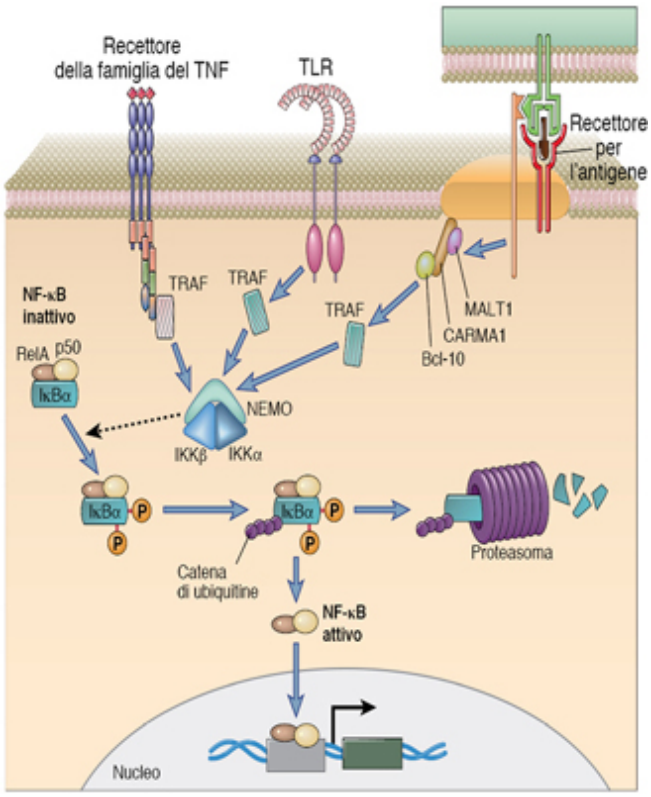


FIGURA 7-26 Via canonica di attivazione di NF-κB. I recettori per l'antigene attivano specifiche PKC in grado di attivare il complesso CARMA/Bcl-10/MALT1, il quale a sua volta favorisce l'induzione di TRAF, una ligasi E3, che può poliubiquitinare NEMO/IKKγ (un componente del complesso IKK) formando catene di ubiquitina di tipo lisina-63. Ciò conduce alla fosforilazione e all'attivazione della chinasi IKKβ da parte di una chinasi a monte. IKKβ fosforila l'inibitore di NF-κB (IκBα), contrassegnandolo per una poliubiquitinazione di tipo lisina-48 e per la conseguente degradazione proteosomiale. La degradazione di IκBα permette ai dimeri attivi di NF-κB di entrare nel nucleo. Anche i TLR, alcuni membri della famiglia dell'IL-1R e molti recettori della famiglia del TNFR possono attivare questa via mediante l'attivazione di proteine della famiglia TRAF.

Come abbiamo già precedentemente sottolineato in questo capitolo, i TLR, il BCR, il TCR e molti recettori per le citochine appartenenti alle famiglie dei TNFR e degli IL-1R attivano questo fattore trascrizionale. Qui esamineremo le vie comuni che, partendo da questi recettori, portano all'attivazione della cascata canonica di NF-κB che consiste nella degradazione di IκBα e nella conseguente migrazione nucleare degli eterodimeri liberati dall'inibitore. Per l'attivazione canonica di NF-κB sono richiesti due tipi di poliubiquitinazione, molto diversi fra loro.

- Il riconoscimento del ligando porta all'attivazione di una specifica ubiquitina ligasi E3 che aggiunge una catena di ubiquitina di tipo lisina-63 a una proteina detta NEMO o IKKγ, subunità non catalitica di un complesso enzimatico noto come IKK (*IκB kinase*). Esso contiene altre due subunità chiamate IKKα e IKKβ, ciascuna delle quali è una potenziale serina/treonina chinasi cataliticamente attiva. L'ubiquitinazione di NEMO permette a IKKβ di essere attivata da una chinasi a monte.
- Una volta attivata, l'IKKβ fosforila l'IκBα, la proteina inibitoria legata a NF-κB, in corrispondenza di due specifiche serine, contrassegnandola per l'ubiquitinazione lisina-48.
- IκBα poliubiquitinata viene quindi degradata dal proteasoma e gli eterodimeri canonici di NF-κB sono così liberi di entrare nel nucleo (vedi Fig. 7-26).

Abbiamo precedentemente visto come il TCR e il BCR attivino rispettivamente la PKC-θ e la PKC-β. Queste PKC possono fosforilare una proteina chiamata CARMA1 che forma un complesso con due proteine chiamate Bcl-10 e MALT1, il quale contribuisce all'attivazione di una ubiquitina ligasi E3 di tipo lisina-63 chiamata TRAF6. Una volta attivata,

TRAF6 può attivare la chinasi TAK1 e anche ubiquitinare la proteina NEMO, facilitando così l'attivazione di IKKβ. Anche i TLR e gli IL-1R1 attivano TRAF6 per attivare l'IKK. Molti membri della famiglia dei recettori del TNFR, tra cui TNFR e CD40, possono attivare la via canonica di NF-κB attraverso l'attivazione di altre TRAF come TRAF2, TRAF3 e TRAF5.

Gli eterodimeri NF-κB2-RelB costituiscono invece la forma non canonica di NF-κB. Questa è attivata da una via differente, particolarmente importante per la biogenesi degli organi linfoidi e per la sopravvivenza dei linfociti B naïve. I due recettori principali che attivano questa via non canonica o "alternativa" sono LTβR (*Lymphotoxin β Receptor*) e BAFFR (*BAFF Receptor*). Essi attivano un complesso simile all'IKK, contenente però omodimeri IKKα, che ubiquitina e degrada una parte del dimero NF-κB2-RelB, cui consegue il rilascio della proteina attiva.

RIEPILOGO

* I recettori sono generalmente localizzati sulla membrana cellulare. La trasduzione del segnale inizia nel citoplasma ed è seguita da una fase nucleare durante la quale viene modificata l'espressione genica.
* Molti tipi di recettori partecipano alle risposte innate e adattative. La categoria più importante è quella dei recettori immunitari, appartenenti a una famiglia nella quale le tirosine chinasi non recettoriali fosforilano, in corrispondenza di motivi ITAM, le code citoplasmatiche delle proteine dei complessi recettoriali contenenti residui di tirosina.
* Altri recettori importanti sono quelli tirosinchinasici, quelli nucleari, quelli serpentinici accoppiati a proteine G eterotrimeriche e quelli della famiglia Notch.
* I recettori per l'antigene dei linfociti T e B, oltre ai recettori Fc per le Ig, appartengono alla famiglia dei recettori del sistema immunitario.
* I recettori per l'antigene possono modulare il livello di attivazione cellulare reclutando un numero variabile di domini ITAM in base all'affinità e alle caratteristiche dell'antigene.
* I corecettori, come CD4 o CD8 dei linfociti T e CD21 (CR2) dei linfociti B, potenziano la trasduzione del segnale dei recettori per gli antigeni. I corecettori legano lo stesso complesso antigenico riconosciuto dal recettore per l'antigene.
* La trasduzione del segnale generata dai recettori per l'antigene può essere attenuata da recettori inibitori.
* Il complesso del TCR è costituito dalle catene TCR α e β, deputate al riconoscimento dell'antigene, e dalle catene in grado di trasdurre CD3 (γ, δ, ε) e da monodimeri della catena ζ. Ciascuna delle catene CD3 contiene un ITAM, mentre ciascuna catena ζ contiene tre ITAM.
* Il legame del TCR all'antigene determina la fosforilazione in tirosina, a opera di chinasi della famiglia Src, degli ITAM del CD3 e delle catene ζ e il reclutamento della chinasi ZAP-70 in corrispondenza dei domini ITAM fosforilati. ZAP-70 contiene due domini SH2, ciascuno dei quali lega una tirosina fosforilata.

* Una volta attivata, ZAP-70 fosforila tirosine presenti sulle proteine adattatrici, le quali permettono di reclutare nel segnalosoma altri enzimi.
* Gli enzimi che scambiano GDP/GTP in proteine G a basso peso molecolare come Ras e Rac permettono di iniziare la via delle MAP chinasi. Questa porta all'induzione o all'attivazione di fattori trascrizionali come Jun e Fos, che costituiscono il fattore trascrizionale AP-1.
* L'attivazione di PLCγ1 porta alla formazione di IP3 a partire da PIP2, il quale determina il rilascio di calcio da depositi intracellulari. Ciò facilita l'apertura di CRAC, un canale di membrana attivato dalla diminuizione della concentrazione di calcio nei depositi intracellulari, e il conseguente mantenimento di elevati livelli di calcio intracellulare. Il calcio, legandosi alla calmodulina, attiva proteine tra cui la calcineurina, una fosfatasi che permette l'ingresso nel nucleo del fattore trascrizionale NFAT.
* Il diacilglicerolo (DAG) viene prodotto in membrana quando PLCγ1 rilascia IP3 da PIP2. Il DAG attiva la PKC-θ, la quale tra le altre cose contribuisce ad attivare NF-κB.
* La chinasi PI3, una chinasi lipidica, converte PIP2 in PIP3 che recluta in membrana e attiva proteine contenenti domini PH. PIP3 attiva le Itk nei linfociti T e le Btk nei B, oltre ad attivare PDK1, una chinasi che può fosforilare Akt, una chinasi che favorisce la sopravvivenza cellulare.
* I recettori costimolatori iniziano la trasduzione del segnale separatamente dai recettori per l'antigene, ma i due segnali sinergizzano a livello nucleare. Il principale recettore costimolatorio dei linfociti T è CD28.
* L'attivazione dei linfociti T può essere inibita da fosfatasi, reclutate da recettori inibitori come CTLA-4 e PD-1, e da ubiquitine ligasi E3, le quali contribuiscono alla monoubiquitinazione e degradazione lisosomiale delle proteine attivate.
* Il recettore dei linfociti B (BCR) è composto da un'immunoglobulina di membrana associata a un eterodimero, unito da un ponte disolfuro, noto come Igα-Igβ. Sia Igα sia Igβ contengono nelle loro code citoplasmatiche un motivo ITAM. Le vie di trasduzione del segnale attivate dal BCR sono molto simili a quelle del TCR.
* L'attenuazione della trasduzione del segnale dei recettori dei linfociti B, T e delle cellule NK dipende da recettori inibitori, i quali molto spesso contengono motivi inibitori contenenti tirosina (ITIM) a livello delle code citoplasmatiche.
* Un ulteriore importante meccanismo di attenuazione del segnale è rappresentato dall'ubiquitinazione delle proteine responsabili della trasduzione del segnale da parte di ubiquitine ligasi E3.
* I recettori per le citochine possono essere divisi in classi in base alla loro struttura e ai meccanismi di trasduzione del segnale.
* Molti recettori per le citochine utilizzano tirosine chinasi non recettoriali chiamate JAK per fosforilare fattori trascrizionali chiamati STAT.
* Alcuni recettori per le citochine, come per esempio quelli appartenenti alla famiglia del recettore per il TNF, attivano NF-κB sia attraverso la via canonica sia attraverso quella alternativa.
* La via canonica di NF-κB viene attivata da molti recettori per le citochine, tra cui quelli della famiglia del TNFR, del TLR/IL-1R e i recettori per l'antigene. Questa via prevede l'attivazione di IKKβ, una catena del complesso IKK, il quale fosforila l'inibitore IκBα che viene successivamente ubiquitinato e degradato dal proteasoma, consentendo l'ingresso di NF-κB nel nucleo

LETTURE CONSIGLIATE

Trasduzione del segnale da parte dei recettori del sistema immunitario

Call M.E.; Wucherpfennig K.W: Common themes in the assembly and architecture of activating immune receptors. Nature *Reviews Immunology* 7:841–850 (2007).

Cannons J.L.; Tangye S.G.; Schwartzberg P.L: SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. *Annual Review of Immunology* 29:665–705 (2011).

Vallabhapurapu S.; Karin M: Regulation and function of NF-κB transcription factors in the immune system. *Annual Review of Immunology* 27:693–733 (2009).

Yuan J.S.; Kousis P.C.; Suliman S.; Visan I.; Guidos C.J: Functions of notch signaling in the immune system: consensus and controversies. *Annual Review of Immunology* 28:343–365 (2010).

Struttura e trasduzione del segnale del TCR

Brownlie R.J.; Zamoyska R: T cell receptor signaling networks: branched, diversified, and bonded. *Nature Reviews Immunology* 13:257–269 (2013).

Burkhardt J.K.; Carrizosa E.; Shaffer M.H: The actin cytoskeleton in T cell activation. *Annual Review of Immunology* 26:233–259 (2008).

Fooksman D.R.; Vardhana S.; Vasiliver-Shamis G.; Liese J.; Blair D.A.; Waite J.; Sacristan C.; Victora G.D.; Zanin-Zhorov A.; Dustin M.L: Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annual Review of Immunology* 28:79–105 (2010).

Gallo E.M.; Cante-Barrett K.; Crabtree G.R: Lymphocyte calcium signaling from membrane to nucleus. *Nature Immunology* 7:25–32 (2006).

Hogan P.G.; Lewis R.S.; Rao A: Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annual Review of Immunology* 28:491–533 (2010).

Kuhns M.S.; Davis M.M.; Garcia K.C: Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity* 24:133–139 (2006).

MacIver N.J.; Michalek R.D.; Rathmell J.C: Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annual Review of immunology* 31:259–283 (2013).

Okkenhaug K: Signaling by the phosphoinositide 3-kinase family in immune cells. *Annual Review of immunology* 31:675–704 (2013).

Pearce E.L.; Poffenberger M.C.; Chang C.H.; Jones R.G: Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science* 342:1242454 (2013).

Rudolph M.G.; Stanfield R.L.; Wilson I.A: How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annual Review of Immunology* 24:419–466 (2006).

Smith-Garvin J.E.; Koretzky G.A.; Jordan M.S: T cell activation. *Annual Review of Immunology* 27:591–619 (2009).

van der Merwe P.; Dushek O: Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nature Reviews Immunology* 11:47–55 (2011).

Waickman A.T.; Powell J.D: Mammalian target of rapamycin integrates diverse inputs to guide the outcome of antigen recognition in T cells. *Journal of Immunology* 188:4721–4729 (2012).

Struttura e trasduzione del segnale del BCR

Harwood N.E.; Batista F.D: Early events in B cell activation. *Annual Review of Immunology* 28:185–210 (2010).

Kurosaki T.; Shinohara H.; Baba Y: B cell signaling and fate decision. *Annual Review of Immunology* 28:21–55 (2010).

Attenuazione del segnale nei linfociti

Acuto O.; Bartolo V.D.; Michel F: Tailoring T-cell receptor signals by proximal negative feedback mechanisms. *Nature Reviews Immunology* 8:699–712 (2008).

Pao L.I.; Badour K.; Siminovitch K.A.; Neel B.G: Nonreceptor protein-tyrosine phosphatases in immune cell signaling. *Annual Review of Immunology* 25:473–523 (2007).

Smith K.G.; Clatworthy M.R: FcγRIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nature Reviews Immunology* 10:328–343 (2010).

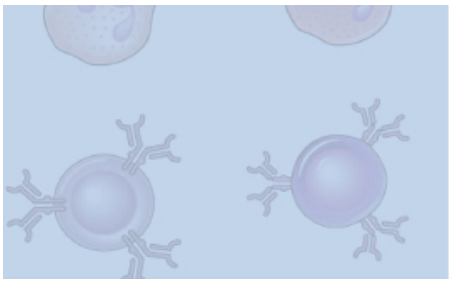
Sun S.C: Deubiquitylation and regulation of the immune response. *Nature Reviews Immunology* 8:501–511 (2008).

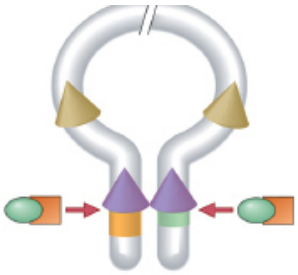
Recettori per le citochine

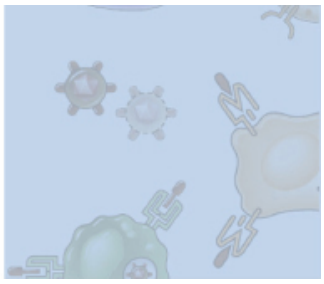
O'Shea J.J.; Holland S.M.; Staudt L.M: JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *New England Journal of Medicine* 368:161–170 (2013).

CAPITOLO

8







Maturazione dei linfociti e riarrangiamento del recettore per l’antigene

CARATTERISTICHE GENERALI DELLA MATURAZIONE LINFOCITARIA

- Differenziazione dei linfociti B e T e proliferazione dei loro precursori
- Epigenetica, microRNA e maturazione linfocitaria
- Riarrangiamento ed espressione dei geni che codificano per il recettore per l’antigene
- Processi di selezione che affinano il repertorio dei linfociti B e T

RIARRANGIAMENTO DEI GENI DEL RECETTORE PER L’ANTIGENE DEI LINFOCITI B E T

- Organizzazione dei geni delle Ig e del TCR nella linea germinativa
- Ricombinazione V(D)J
- Diversificazione dei linfociti B e T

SVILUPPO DEI LINFOCITI B

- Stadi dello sviluppo dei linfociti B
- Selezione del repertorio dei linfociti B maturi

SVILUPPO DEI LINFOCITI T

- Ruolo del timo nella maturazione dei linfociti T
- Stadi della maturazione T
- Processi di selezione nella maturazione dei linfociti T αβ ristretti per MHC
- Linfociti T γδ

RIEPILOGO

I linfociti esprimono recettori per l’antigene estremamente diversificati e quindi in grado di riconoscere un’ampia varietà di antigeni. Tale diversificazione si genera durante lo sviluppo dei linfociti B e T da precursori che non esprimono i recettori per l’antigene e non sono in grado di riconoscere e rispondere agli antigeni. Il processo attraverso il quale i progenitori dei linfociti presenti negli organi linfoidi primari (il timo e il midollo osseo) si trasformano nei linfociti maturi che popolano i tessuti linfoidi secondari è definito **sviluppo dei linfociti** o **maturazione linfocitaria** (i termini sviluppo e maturazione saranno usati in questo contesto in modo intercambiabile). È proprio durante tale processo che si genera l’ampio repertorio dei diversi recettori per l’antigene (e quindi la specificità) espressa dai linfociti B e T. Il processo di maturazione dei

linfociti B e T è innescato da segnali generati da recettori di membrana in grado di determinare due tipi di effetti biologici: la stimolazione della proliferazione dei progenitori e l'induzione del riarrangiamento dei geni per i recettori per l'antigene. Il processo di riarrangiamento rappresenta un elemento cruciale nell'indirizzare la differenziazione di una cellula progenitrice verso la linea linfocitaria B o T.

Iniziamo questo capitolo con la trattazione del processo di maturazione dei progenitori dei linfociti B e T, descrivendo prima i meccanismi molecolari comuni ai due diversi processi differenziativi, per poi arrivare ai processi che sono invece specifici per lo sviluppo dei linfociti B e per i linfociti T.

CARATTERISTICHE GENERALI DELLA MATURAZIONE LINFOCITARIA

La maturazione dei linfociti B e T consiste in una serie di eventi che avvengono negli organi linfoidi primari (Fig. 8-1).

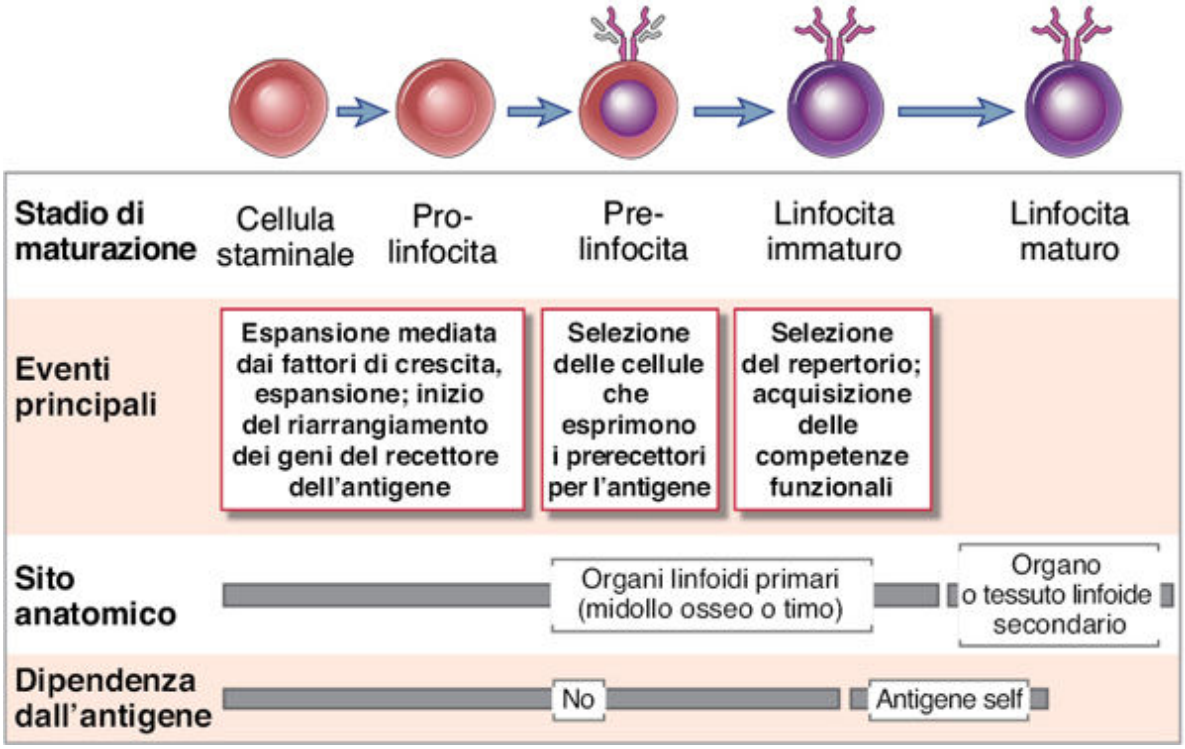


FIGURA 8-1 Stadi della maturazione dei linfociti. Lo sviluppo dei linfociti B e T prevede diversi stadi di maturazione. Viene qui mostrata la maturazione del linfocita B, che nelle sue tappe fondamentali è simile a quella del linfocita T.

- ***Orientamento dei progenitori*** verso la linea differenziativa B o T.
- ***Proliferazione*** delle cellule progenitrici e dei linfociti in via di differenziazione, per aumentare il numero di cellule in grado di generare linfociti maturi.
- ***Riarrangiamento dei geni del recettore per l'antigene*.** Tale processo, sequenziale e coordinato, è necessario per la corretta espressione dei diversi recettori per l'antigene (i termini riarrangiamento e ricombinazione saranno usati in questo contesto in modo intercambiabile).
- ***Eventi atti a selezionare*** le cellule dotate di un recettore funzionante e a eliminare quelle potenzialmente pericolose in grado di riconoscere con elevata affinità gli antigeni self. Questi meccanismi di controllo assicurano che, raggiunta la maturazione, i linfociti esprimano recettori funzionanti dotati di specificità "utili" al sistema immunitario.
- ***Differenziazione dei linfociti B e T in sottopopolazioni distinte per fenotipo e funzioni*.** I linfociti B si differenziano in linfociti B follicolari, in linfociti della zona marginale e in linfociti B-1. I linfociti T si differenziano invece in linfociti $CD4^+$ helper, linfociti $CD8^+$ αβ citotossici, linfociti NKT e in linfociti T γδ. Le specifiche funzioni di queste diverse sottopopolazioni linfocitarie saranno discusse più avanti in questo capitolo.

Differenziazione dei linfociti B e T e proliferazione dei loro precursori

***Le cellule staminali pluripotenti presenti nel fegato fetale e nel midollo osseo, note come cellule staminali ematopoietiche (*Hematopoietic Stem Cells*, HSC), danno origine a tutte le cellule circolanti, inclusi i linfociti*.** Maturando, le HSC danno origine a progenitori linfoidi comuni, che a loro volta danno origine ai linfociti B e T, alle cellule linfoidi innate e ad alcuni tipi di cellule dendritiche (Fig. 8-2). La maturazione dei linfociti B avviene prevalentemente nel midollo osseo e, prima della nascita, anche nel fegato fetale. Le HSC epatiche fetali danno origine prevalentemente a un particolare tipo di linfociti B definiti B-1, mentre le HSC midollari daranno

origine alla maggior parte dei linfociti B circolanti (*linfociti B follicolari*) nonché a una sottopopolazione di linfociti B detti linfociti B della zona marginale. I precursori dei linfociti T che lasciano il fegato fetale o il midollo prima e dopo la nascita, rispettivamente, entrano in circolo raggiungendo successivamente il timo, dove completano la loro maturazione. La maggior parte dei linfociti T, che sono quelli del tipo αβ derivano dalle HSC del midollo osseo, mentre i linfociti T δγ derivano principalmente dalle HSC presenti nel fegato fetale. È da notare che i linfociti B e T che si sviluppano durante il periodo fetale sono caratterizzati da una limitata diversificazione del repertorio recettoriale. Infine, è interessante notare come, pur avvenendo in luoghi anatomici diversi, i primi eventi maturativi dei linfociti B e T siano fondamentalmente simili.

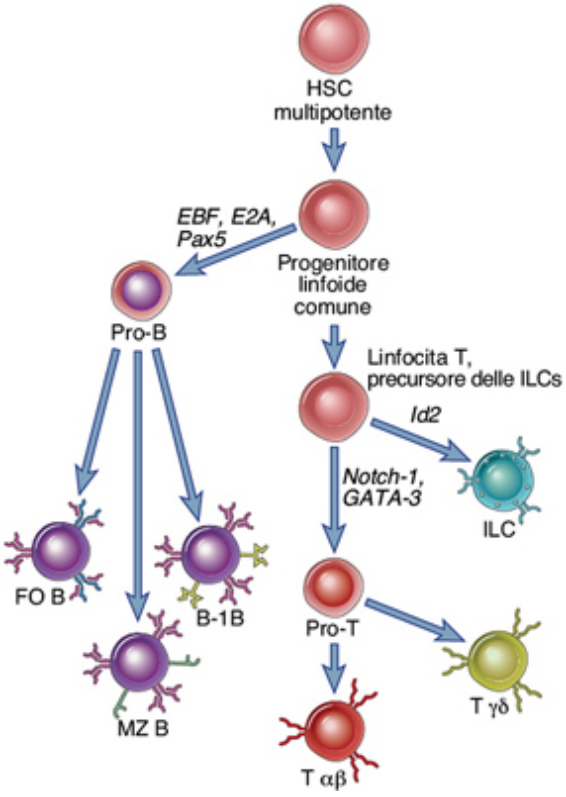


FIGURA 8-2 Le cellule staminali pluripotenti danno origine alle linee differenziative B e T. Le cellule staminali ematopoietiche (HSC) danno origine a progenitori distinti per i diversi tipi di cellule ematiche. Una di queste popolazioni di progenitori (mostrata in figura) è definita progenitore linfoide comune e dà origine prevalentemente a linfociti B e T, ma contribuisce anche a generare cellule NK e alcune cellule dendritiche (non mostrato in figura). I linfociti pro-B si potranno differenziare in linfociti B follicolari (FO B), linfociti B della zona marginale (MZ B) e linfociti B-1 (B-1). I linfociti pro-T possono dare origine ai linfociti T αβ o γδ. Il processo irreversibile di indirizzamento verso le diverse linee differenziative è regolato da diversi fattori di trascrizione, indicati in corsivo. HSC, cellula ematopoietica staminale; ILC, cellula linfoide innata.

L'indirizzamento verso la linea differenziativa B o T è determinato dall'attivazione di recettori di membrana che inducono l'espressione di specifici fattori trascrizionali, che a loro volta inducono un progenitore linfoide comune a differenziarsi in un linfocita B o T. I recettori di superficie e i fattori trascrizionali che dirigono il differenziamento inducono l'espressione di proteine che, riuscendo a interagire con specifici loci del gene codificante il recettore per l'antigene, ne regolano il riarrangiamento (processo che sarà descritto più avanti in questo stesso capitolo). Per esempio, nel caso della maturazione di un linfocita B, il locus della catena pesante delle immunoglobuline (Ig), originariamente presente in una configurazione in cui la cromatina è inaccessibile, viene "smascherato" e reso accessibile alle proteine regolatrici che ne determineranno il riarrangiamento e l'espressione, eventi entrambi necessari per la generazione di un recettore funzionante. In modo simile, il locus del gene che codifica per la catena β del recettore cellule dei linfociti T (*T Cell Receptor*, TCR) viene reso accessibile alle proteine regolatrici durante la maturazione dei linfociti T αβ. Va infine notato come, oltre ai geni che codificano per le proteine regolatrici, in questo stadio maturativo vengano anche espressi molti altri geni coinvolti nella differenziazione dei linfociti B o T.

Diverse classi di fattori trascrizionali guidano la differenziazione delle cellule progenitrici in linfociti B o T (vedi Fig. 8-2). I fattori di trascrizione Notch-1 e GATA-3 dirigono la differenziazione dei linfociti specificamente verso la linea T. Notch è una famiglia di proteine di membrana attivate dalla loro proteolisi controllata innescata dall'interazione con ligandi specifici presenti su cellule adiacenti. La porzione intracellulare di Notch così generata migra verso il nucleo dove andrà a modulare l'espressione di specifici geni bersaglio. Nelle cellule progenitrici linfoidi, Notch-1 viene attivato insieme a GATA3, inducendo l'espressione di una serie di geni

necessari per l'ulteriore sviluppo dei linfociti T αβ. Alcuni di questi geni codificano per componenti del pre-TCR e per proteine necessarie al processo di ricombinazione V(D)J (descritto più avanti). I fattori di trascrizione EBF, E2A e Pax-5 inducono invece l'espressione di geni coinvolti nello sviluppo dei linfociti B, tra cui quelli che codificano per le proteine Rag-1 e Rag-2, le proteine surrogate delle catene leggere, e per le proteine Igα e Igβ (necessarie per la trasduzione del segnale da parte del recettore per l'antigene dei linfociti pre-B e B). Anche il ruolo di questi recettori nello sviluppo dei linfociti B verrà preso in considerazione più avanti in questo stesso capitolo.

Durante lo sviluppo dei linfociti B e T, le cellule progenitrici già indirizzate verso le distinte linee differenziative proliferano dapprima in risposta alle citochine e quindi in risposta ai segnali generati da un recettore pre-antigene che seleziona le cellule che hanno correttamente riarrangiato il primo gruppo di geni codificanti per il recettore per l'antigene. L'attività mitotica fa sì che venga generato un pool abbastanza numeroso di cellule che daranno vita a un repertorio molto ampio di linfociti antigene-specifici. Nei roditori, la citochina interleuchina 7 (IL-7) è responsabile della proliferazione dei progenitori dei linfociti B e T; nell'uomo, l'IL-7 è invece necessaria per la proliferazione dei progenitori dei linfociti T ma non dei B. L'IL-7 è sintetizzata dalle cellule stromali del midollo osseo e nel timo dalle cellule epiteliali e da altri tipi di cellule. Topi con mutazioni localizzate sia nel gene dell'IL-7 sia in quello del suo recettore mostrano un deficit di maturazione nelle fasi precoci dello sviluppo dei linfociti B e T, con un conseguente difetto funzionale. Mutazioni nella catena comune γ, condivisa dai recettori per diverse citochine incluse IL-2, IL-7 e IL-15, provocano un'immunodeficienza definita **immunodeficienza grave combinata legata al cromosoma X** (*X-linked Severe Combined Immunodeficiency Disease*, X-SCID) (vedi Cap. 21). Tale malattia è caratterizzata principalmente dal blocco dello sviluppo dei linfociti T e delle cellule NK pur in presenza di un normale sviluppo dei linfociti B, dimostrando così l'effettiva necessità di IL-7 per lo sviluppo dei linfociti T umani e di IL-15 per le cellule NK.

Il più imponente evento proliferativo dei precursori linfocitari può avvenire solo dopo il corretto riarrangiamento dei geni codificanti per una delle due catene del recettore per l'antigene, processo che porta alla

produzione del pre-recettore per l'antigene (descritto di seguito). I segnali generati da questi pre-recettori hanno un ruolo più importante nell'espansione della popolazione dei linfociti che si stanno differenziando di quello di citochine come IL-7.

Epigenetica, microRNA e maturazione linfocitaria

Molti degli eventi nucleari associati allo sviluppo delle diverse sottopopolazioni linfocitarie sono regolati da meccanismi epigenetici. Il termine epigenetica identifica una serie di meccanismi deputati al controllo dell'espressione genica (così come al riarrangiamento genico durante lo sviluppo dei linfociti) che vanno al di là della mera sequenza di DNA dei singoli geni. Nei cromosomi, il DNA si associa strettamente agli istoni e a proteine non istoniche a formare la cosiddetta cromatina. Il DNA nella cromatina si avvolge attorno a un nucleo proteico di octameri istonici andando a costituire i cosiddetti nucleosomi, che possono rimanere ben separati tra loro oppure raggrupparsi in strutture densamente concentrate. La cromatina può pertanto esistere in forma relativamente dispersa (la cosiddetta eucromatina, dove i geni sono prontamente disponibili alla trascrizione) oppure in forma densamente concentrata (la cosidetta eterocromatina, dove i geni inaccessibili vengono mantenuti in uno stato silente). L'organizzazione strutturale delle diverse porzioni dei cromosomi può pertanto variare, rendendo taluni geni accessibili al legame con fattori di trascrizione in alcuni tipi cellulari ma non in altri.

I meccanismi che regolano la diversa organizzazione della cromatina (e quindi la diversa accessibilità dei geni ai fattori trascrizionali) vengono considerati meccanismi epigenetici. Tra questi, la metilazione dei residui di citosina del DNA (che porta generalmente al silenziamento del gene interessato), modificazioni post-traslazionali quali l'acetilazione, la metilazione e l'ubiquitinazione delle code istoniche dei nucleosomi (che possono portare sia all'attivazione che all'inattivazione genica, a secondo dell'istone modificato e dal tipo di modificazione), il rimodellamento attivo della cromatina ad opera dei cosiddetti complessi di rimodellamento della cromatina (anch'essi in grado di indurre o inibire l'espressione genica) e infine il silenziamento dell'espressione genica ad opera di RNA non codificanti.

Diversi dei passaggi cruciali dello sviluppo linfocitario sono regolati da meccanismi epigenetici.

- Modificazioni istoniche in particolari loci del gene codificante per il recettore per l'antigene sono necessarie al reclutamento delle proteine responsabili del processo di ricombinazione, necessario per dare origine a recettori per l'antigene funzionali.
- Lo sviluppo di un linfocita $CD4^+$ *vs* $CD8^+$ dipende da meccanismi epigenetici che silenziano l'espressione del gene CD4 nei linfociti T $CD8^+$. Tale silenziamento coinvolge una serie di modificazioni della cromatina che pongono il gene CD4 nella forma di eterocromatina inaccessibile.
- Nel Capitolo 7, abbiamo descritto come i microRNA (miRNA) svolgano un importante ruolo nell'attivazione dei linfociti T. Essi contribuiscono anche in misura significativa alla modulazione dell'espressione genica e proteica durante il loro sviluppo. Come già citato nel Capitolo 7, Dicer è un enzima essenziale nella generazione di miRNA. La delezione di Dicer nella linea differenziativa dei linfociti T determina la perdita selettiva di linfociti T regolatori e il conseguente sviluppo di un fenotipo autoimmune simile a quello osservato in assenza del gene FoxP3 (descritto nei Capitoli 15 e 21). La perdita di Dicer nella linea differenziativa B comporta invece un blocco a livello della transizione da linfociti pro-B a linfociti pre-B (descritto in maggior dettaglio più avanti in questo stesso capitolo), a causa della maggiore suscettibilità dei linfociti pre-B all'apoptosi. I membri di una particolare famiglia di miRNA, i miR17-92, svolgono un ruolo chiave nella protezione dei linfociti pre-B dall'apoptosi, sia inibendo direttamente l'espressione di Bim, un membro della famiglia di proteine pro-apoptotiche di Bcl-2, sia inibendo l'espressione di PTEN, un'inositolo fosfatasi che favorisce l'espressione di Bim. Studi mediante ablazione genica hanno rivelato che anche molti altri miRNA sono coinvolti in modo specifico in altre fasi dello sviluppo dei linfociti B e T.

Riarrangiamento ed espressione dei geni che codificano per il recettore per l'antigene

Il riarrangiamento dei geni del recettore per l'antigene costituisce l'evento chiave nella maturazione linfocitaria, essenziale per la generazione di un repertorio diversificato. Come discusso nel Capitolo 7, ogni clone linfocitario B o T produce un recettore dotato di caratteristiche di riconoscimento per l'antigene uniche. In ogni individuo possono esistere più di 10^7 diversi cloni di linfociti B e T, ognuno dotato di uno specifico recettore. La capacità di ciascun individuo di generare un repertorio linfocitario così diversificato si è sviluppata in modo tale da non richiedere un corrispondente numero di geni che codifichino per i recettori per l'antigene; se così non fosse, una grande parte del genoma dei mammiferi sarebbe dedicata a codificare l'elevato numero di Ig e TCR. I geni in grado di codificare per i recettori per l'antigene sono prodotti nei linfociti B immaturi, nel midollo osseo, e nei linfociti T immaturi, nel timo, attraverso un processo di riarrangiamento genico che genera un enorme numero di esoni, in grado di codificare per la regione variabile del recettore, pur partendo da una frazione di genoma relativamente piccola. Durante la maturazione, in ogni singolo linfocita uno dei diversi segmenti genici che codificano per le regioni variabili viene scelto a caso e coniugato a un segmento di DNA successivo. Gli eventi di riarrangiamento del DNA necessari alla sintesi dei recettori per l'antigene non dipendono e non sono influenzati dalla presenza dell'antigene. In altre parole, i diversi recettori per l'antigene sono generati ed espressi prima che avvenga l'incontro con l'antigene stesso (vedi Fig. 1-7). Ci soffermeremo sui meccanismi molecolari del riarrangiamento del recettore per l'antigene più avanti in questo capitolo.

Processi di selezione che affinano il repertorio dei linfociti B e T

Durante lo sviluppo linfocitario sono presenti numerosi punti di controllo (definiti "checkpoints") i quali assicurano che solo le cellule che hanno correttamente portato a termine le varie fasi della differenziazione proseguano nel processo di maturazione. Uno di questi punti di controllo si basa sulla corretta espressione di una delle due catene del recettore per l'antigene, mentre in un punto successivo verranno controllati il corretto assemblaggio e la funzionalità del recettore completo. Il superamento di questi controlli garantisce che vengano selezionati per l'ulteriore

maturazione solo quei linfociti che, avendo completato correttamente il riarrangiamento dei geni per il recettore, possono svolgere la loro funzione al termine della maturazione. I punti di controllo successivi avranno lo scopo di eliminare i linfociti autoreattivi, potenzialmente pericolosi, oppure di orientare i linfociti verso specifiche forme di differenziazione. Di seguito riassumeremo i principi generali di questi processi di selezione.

Sia i pre-recettori per l'antigene sia i recettori per l'antigene trasmettono segnali essenziali per la sopravvivenza, la proliferazione e la continuazione del processo maturativo dei linfociti (Fig. 8-3). I pre-recettori per l'antigene, definiti pre-BCR nei linfociti B e pre-TCR nei linfociti T, sono recettori in grado di trasdurre segnali che vengono espressi nel corso dello sviluppo linfocitario; essi contengono solo una delle catene che compongono il recettore per l'antigene maturo. I pre-BCR contengono la catena pesante di Ig μ, mentre i pre-TCR contengono la catena TCR β. Per riuscire a esprimere le catene Ig μ o TCR β, i linfociti B o T devono prima andare incontro a riarrangiamenti dei geni che codificano per i recettori, un processo che necessita l'esposizione di particolari loci genici (presenti sia nei geni per il TCR sia in quelli per le Ig nei linfociti B) e quindi la loro fusione con particolari segmenti di DNA necessari a generare un recettore funzionale. Al fine di ottenere la massima diversificazione possibile tra i recettori generati, diversi nucleotidi vengono inoltre aggiunti o rimossi casualmente dai segmenti genici che si congiungono. Nel corso della maturazione linfocitaria, i primi geni a essere completamente riarrangiati sono quelli per la catena pesante delle Ig (gene *IgH*) nei linfociti B e quelli per la catena β del TCR nei linfociti T αβ. (Anche se per convenzione i nomi dei geni si indicano in corsivo, in questo capitolo non seguiremo questa regola per motivi di praticità.) I precursori dei linfociti B che avranno riarrangiato correttamente i geni per le catene pesanti delle Ig esprimeranno quindi la catena pesante μ, che agirà da recettore provvisorio (pre-BCR). Analogamente, i precursori dei linfociti T che avranno correttamente riarrangiato il gene corrispondente esprimeranno la catena β del TCR, che agirà da recettore provvisorio (pre-TCR). Solo un terzo dei precursori dei linfociti B e T che vanno incontro al riarrangiamento genico riesce a portare a termine tale processo in modo corretto generando così una proteina completa e funzionante. Nel caso che i linfociti non abbiano correttamente riarrangiato i loci per la catena Ig μ o per la catena β del TCR non

esprimeranno un recettore provvisorio funzionante e non riceveranno i necessari segnali di sopravvivenza, andando incontro a morte cellulare programmata. Ne deriva che l'assemblaggio dei recettori pre-BCR e pre-TCR è assolutamente necessario per ricevere segnali di sopravvivenza e proliferazione, oltre che per il fenomeno dell'esclusione allelica (vedi più avanti), tutti aspetti necessari per il proseguimento della maturazione. In conclusione, l'espressione dei recettori provvisori rappresenta il primo punto di controllo nello sviluppo linfocitario.

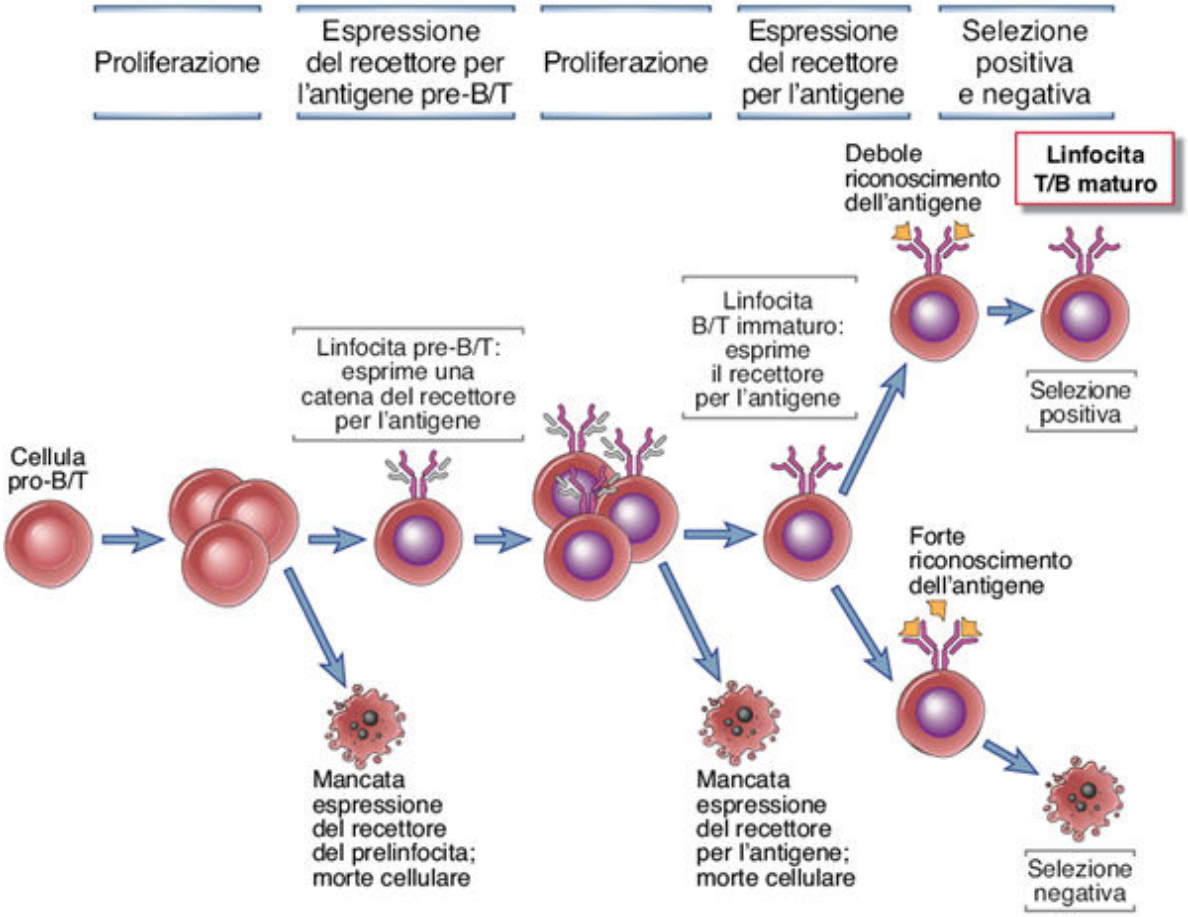


FIGURA 8-3 Punti di controllo nella maturazione dei linfociti. Durante la loro maturazione, i linfociti che esprimono i recettori necessari per continuare la proliferazione e la differenziazione sono selezionati per sopravvivere. Al contrario, i linfociti che non esprimono recettori funzionali muoiono per apoptosi. La selezione positiva e quella negativa preservano ulteriormente le cellule con specificità "utile". La presenza di numerosi punti di controllo assicura che solo i linfociti con recettori adeguati completino la loro maturazione.

A seguito degli eventi descritti, i linfociti B e T in corso di sviluppo cominceranno a esprimere recettori per l'antigene completi e funzionanti e

saranno quindi selezionati per la sopravvivenza in base a ciò che tali recettori possono riconoscere. I linfociti che hanno superato il checkpoint del pre-recettore procedono al riarrangiamento e all'espressione dei geni codificanti la seconda catena del BCR o del TCR, esprimendo così sulla loro superficie il recettore completo e funzionante. In questa fase, i linfociti sono ancora in uno stadio immaturo in cui le cellule autoreattive, potenzialmente pericolose, possono essere eliminate o indotte a modificare i propri recettori, mentre quelle che esprimono recettori "utili" vengono mantenute in vita (Fig. 8-3). Il processo che salvaguarda i linfociti dotati di specificità "utile" è detto **selezione positiva** ed è indissolubilmente connesso al processo di differenziazione dei linfociti nelle diverse sottopopolazioni. Durante lo sviluppo dei linfociti T, la selezione positiva garantisce la maturazione di cellule dotate di recettori in grado di riconoscere le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) e di corecettori (CD8 o CD4) in grado di riconoscere rispettivamente le molecole MHC (di classe I o II). I linfociti T maturi, i cui precursori sono stati selezionati positivamente nel timo, saranno quindi in grado di riconoscere, nei tessuti periferici, antigeni peptidici esogeni presentati dalle molecole MHC self espresse dalle cellule che presentano l'antigene. Analogamente, durante la maturazione dei linfociti B, la selezione positiva preserva i linfociti che esprimono recettori per l'antigene funzionali. Tale processo avviene in modo coordinato con il processo di differenziazione nelle diverse sottopopolazioni (vedi più avanti).

La **selezione negativa** è il processo che elimina o modifica i linfociti dotati di recettori che riconoscono con elevata affinità gli antigeni self presenti negli organi linfoidi primari. Durante la maturazione, sia i linfociti B sia i linfociti T sono sottoposti al processo di selezione negativa nel breve periodo successivo all'espressione del recettore per l'antigene. Durante questa fase, i linfociti T immaturi che possiedono un'elevata affinità per gli antigeni self vengono eliminati per apoptosi, fenomeno conosciuto come **delezione clonale**. I linfociti B immaturi dotati di forte autoreattività possono essere indotti a riarrangiare ulteriormente i geni delle Ig al fine di modificare la loro specificità, fenomeno chiamato **editing recettoriale**. Se l'editing recettoriale non va a buon fine, il linfocita B autoreattivo muore per delezione clonale. La selezione negativa dei linfociti rappresenta un importante meccanismo per il mantenimento della tolleranza al self,

fenomeno definito **tolleranza centrale**, poiché avviene negli organi linfoidi centrali (primari) (vedi Cap. 15).

Dopo questa introduzione, procediamo a una trattazione più dettagliata del processo di maturazione dei linfociti partendo dall'evento chiave: il riarrangiamento e l'espressione dei geni che codificano per il recettore per l'antigene.

RIARRANGIAMENTO DEI GENI DEL RECETTORE PER L'ANTIGENE DEI LINFOCITI B E T

I geni per i diversi recettori per l'antigene sono generati nei singoli linfociti dal riarrangiamento di diversi segmenti genici della regione variabile (V) con segmenti genici della regione della diversità (D) e/o quelli della ricongiunzione (J, dall'inglese "joining"). Per ognuno di questi geni viene generato un nuovo esone riarrangiato mediante la fusione di un segmento a monte con uno a valle del gene V sullo stesso cromosoma. Questo peculiare processo di riarrangiamento selettivo è definito **ricombinazione V(D)J**. Una delle scoperte più rilevanti dell'immunologia moderna è stata proprio la comprensione dei meccanismi che regolano il riarrangiamento dei recettori per l'antigene e quindi della diversificazione della risposta immunologica.

Le prime intuizioni sui meccanismi che permettono la generazione di milioni di recettori per antigeni diversi a partire da un limitato numero di geni derivarono dall'analisi delle sequenze aminoacidiche delle Ig. Queste analisi mostrarono che le catene polipeptidiche di anticorpi dello stesso isotipo condividono le sequenze presenti all'estremità C-terminale (corrispondente, nel gene, alla regione che codifica per i domini costanti delle catene leggere e pesanti), ma differiscono anche notevolmente nelle regioni situate all'estremità *N*-terminale, corrispondenti alle regioni geniche che codificano per i domini variabili (vedi Cap. 5). In aperto contrasto con le nozioni della genetica molecolare riassunte nella cosiddetta teoria un gene-una proteina), fu avanzata la teoria secondo la quale ciascuna catena anticorpale fosse in realtà codificata da almeno due geni, uno variabile e

l’altro costante, che si uniscono fisicamente a livello del DNA o dell’RNA messaggero (mRNA) per generare le Ig. La prova formale di questa ipotesi venne solo un decennio più tardi, quando Susumu Tonegawa dimostrò che nelle cellule del mieloma o del plasmocitoma (un tumore secernente anticorpi) la struttura dei geni per le Ig è diversa da quella presente nelle cellule dei tessuti embrionali o comunque non linfoidi non destinati a produrre Ig. Queste differenze si generano poiché sequenze di DNA (che si trovano separate all’interno dei loci codificanti per le catene pesanti e leggere delle Ig originariamente ereditati) si riarrangiano solo nei linfociti B in corso di maturazione ma non in altre cellule. Un processo simile si verifica anche nei loci che codificano per le catene del TCR nei linfociti T in corso di maturazione. La ricombinazione dei geni per i recettori per l’antigene diventa più facilmente comprensibile prendendo in esame l’organizzazione dei geni delle Ig e del TCR non riarrangiati o in configurazione germinativa e quella riarrangiata, presente durante la fase maturativa dei linfociti.

Organizzazione dei geni delle Ig e del TCR nella linea germinativa

La configurazione germinativa dei loci genici per le Ig e per il TCR è fondamentalmente simile in tutte le cellule ed è caratterizzata dalla segregazione spaziale di numerose sequenze codificanti per i domini variabili e da un numero relativamente basso di sequenze codificanti per i domini costanti dei diversi recettori; distinte sequenze codificanti per le regioni variabili vengono congiunte a sequenze che codificano per le regioni costanti, per generare i singoli linfociti. Di seguito descriveremo prima i loci per le Ig e successivamente i loci per il TCR.

Organizzazione dei loci genici per le Ig

Tre loci separati codificano rispettivamente per tutte le catene pesanti, le catene leggere di tipo κ e quelle di tipo λ delle Ig. Ogni locus è localizzato su un diverso cromosoma. L’organizzazione dei geni per le Ig umane è illustrata nella Figura 8-4 e la relazione tra i segmenti genici e i domini delle catene pesanti e leggere delle Ig nella Figura 8-5, *A*. I geni per le Ig sono organizzati essenzialmente nello stesso modo in tutti i mammiferi, tuttavia la

localizzazione cromosomica, il numero e la sequenza dei diversi segmenti genici presenti in ciascun locus possono variare.

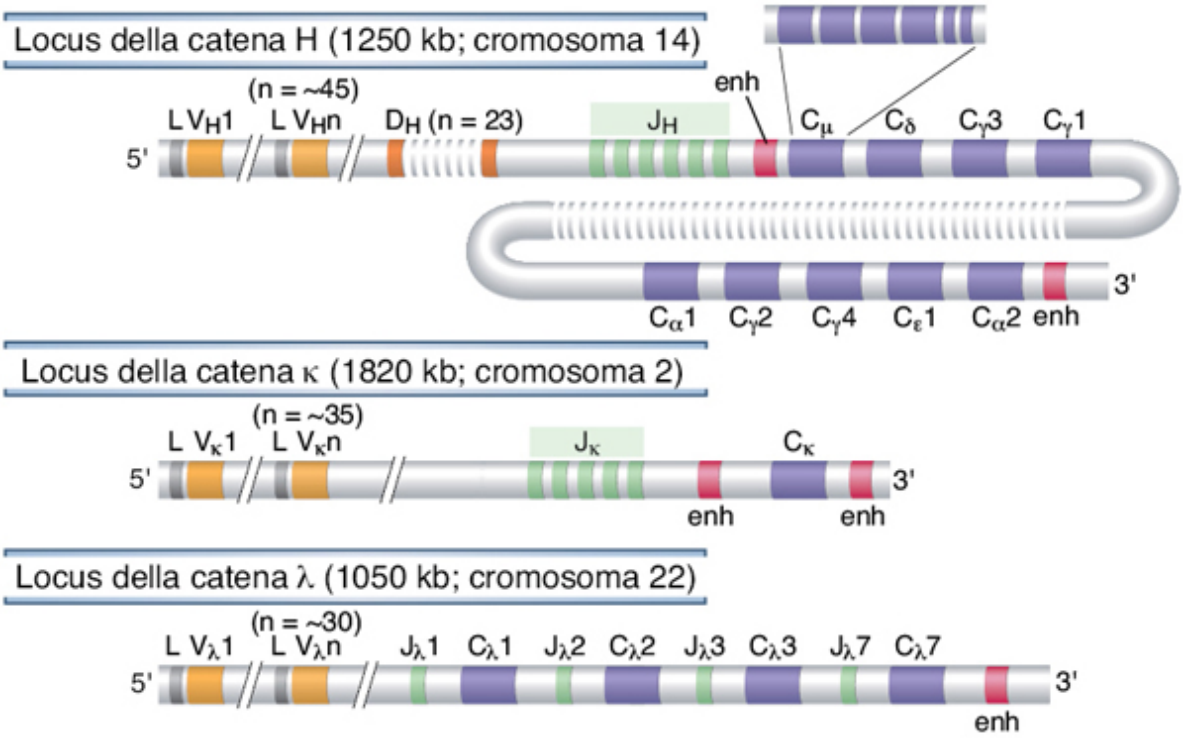


FIGURA 8-4 Organizzazione dei loci Ig umani nella configurazione germinativa. Sono illustrati i loci per le catene pesanti e quelli per le catene leggere κ e λ nell'uomo. Vengono mostrati solo i geni funzionali; gli pseudogeni sono stati omessi per semplicità. Esoni e introni non sono rappresentati in scala. I geni C_H sono mostrati come un singolo riquadro, pur essendo costituiti da diversi esoni, come invece illustrato per C_μ. I segmenti genici sono indicati come: L, leader (comunemente definita sequenza segnale); V, variabile; D, diversità; J, giunzione C, costante; enh, enhancer. In questa figura, così come nelle successive, le strutture tubulari rappresentano segmenti a doppio filamento dei cromosomi con le estremità 5' e 3' relative alle sequenze codificanti.

All'estremità 5' di ciascun locus per le Ig vi è un cluster di geni V (variabile), ciascuno dei quali è costituito da circa 300 bp. Il numero dei geni V varia considerevolmente tra i diversi loci delle Ig delle diverse specie: nell'uomo esistono circa 35 geni V per la catena leggera κ, 30 per la catena leggera λ e 45 per le catene pesanti, mentre nel topo il locus κ possiede circa 30 geni V, il locus per la catena leggera λ possiede solo due geni V e il locus della catena pesante oltre 1000 di cui circa 250 funzionali. I segmenti genici V sono distribuiti in un'ampia regione di DNA di circa 2000 kb. Localizzato all'estremità 5′ di ogni segmento V c'è un esone "leader" che codifica i 20-30 residui *N*-terminali della proteina. Questa sequenza, definita anch'essa

leader, è moderatamente idrofobica e rappresenta la sequenza segnale presente in tutte le proteine neosintetizzate secrete o transmembrana. La sequenza leader svolge un ruolo importante durante la sintesi proteica guidando i polipeptidi nascenti dai ribosomi al lume del reticolo endoplasmatico. Qui la sequenza leader viene rapidamente rimossa, venendo perciò a mancare nella proteina matura. A monte di ogni esone leader c'è un promotore del gene V dove inizia la trascrizione che, come vedremo più avanti, avviene più efficientemente una volta avvenuto il riarrangiamento.

A una distanza variabile, in posizione 3′rispetto ai geni V, si trovano i segmenti genici J (*joining*; unione), strettamente associati agli esoni che codificano per la regione costante localizzati più a valle. I segmenti genici J sono in genere lunghi 30-50 bp e sono separati da sequenze non codificanti. Tra i geni V e J, nel locus H per le Ig, si trovano sequenze codificanti aggiuntive note come segmenti D (diversità). I segmenti genici D non sono presenti nei loci delle catene leggere di Ig. Così come per i geni V, il numero di geni J e D può variare nei diversi loci Ig e nelle diverse specie.

Ogni locus per le Ig subisce un proprio riarrangiamento che coinvolge un certo numero di geni della regione C. Nell'uomo il locus per la catena leggera κ delle Ig ha un singolo gene C (C_κ), mentre il locus per la catena leggera λ ha 4 geni C funzionali (C_λ). Il locus per la catena pesante delle Ig ha 9 geni C (C_H), localizzati in modo tale da codificare i 9 diversi isotipi e sottotipi delle Ig (vedi Cap. 5). I geni C_κ e C_λ sono composti ognuno da un solo esone, che codifica per l'intera catena leggera. Invece, ogni gene C_H è composto da 5 o 6 esoni; 3 o 4 di questi (ognuno di dimensione simile a un segmento del gene V) codificano per la sequenza C_H della catena pesante delle Ig, mentre 2 esoni di dimensioni minori codificano per la porzione carbossiterminale della forma di membrana, inclusi i domini transmembrana e citoplasmatico (vedi Fig. 8-5, *A*).

Nelle catene leggere κ e λ, il dominio V è codificato da segmenti genici V e J, mentre nelle catene pesanti il dominio V è codificato da segmenti genici V, D e J (vedi Fig. 8-5, *A*). Nel caso dei domini V delle Ig H e TCR β, i residui giunzionali posti a cavallo dei segmenti genici V e D o D e J riarrangiati, così come le stesse sequenze dei segmenti genici D e J, formano la cosiddetta *terza regione ipervariabile* (conosciuta anche come *regione che determina la complementarietà 3* o CDR3). I residui giunzionali posti a

cavallo dei segmenti genici V e J riarrangiati, così come le stesse sequenze dei segmenti genici J, formano invece la terza regione ipervariabile delle catene leggere delle Ig. Le regioni CDR1 e CDR2 sono codificate nella configurazione germinativa da un segmento presente in ogni gene V. I domini V e C delle Ig (e del TCR) hanno caratteristiche strutturali simili, compresa la struttura terziaria, definita *dominio Ig*. Come detto nel Capitolo 5, le proteine che possiedono questa struttura sono membri della superfamiglia delle Ig.

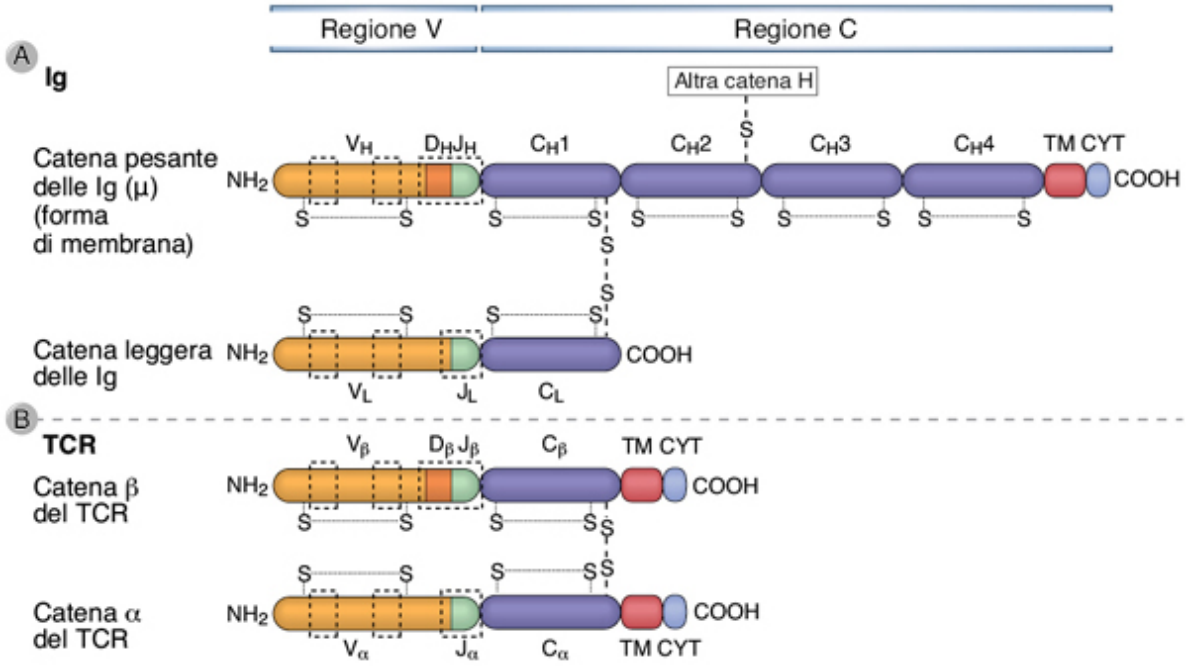


FIGURA 8-5 Domini delle Ig e del TCR. In **A** sono mostrati i domini delle catene leggere e pesanti delle Ig e in **B** quelli delle catene α e β del TCR. Sono anche indicate le relazioni tra i segmenti genici per le Ig e per il TCR e la struttura a domini delle catene polipeptidiche. Le regioni variabili (V) e costanti (C) di ciascun polipeptide sono codificate da diversi segmenti genici. Le localizzazioni dei ponti disolfuro (S-S) sono approssimative. Le aree nei riquadri tratteggiati sono le regioni di ipervariabilità (determinanti la complementarietà). Nelle catene μ delle Ig e nelle catene α e β del TCR, i domini transmembrana (TM) e citoplasmatico (CYT) sono codificati da esoni diversi.

Le sequenze non codificanti dei loci Ig svolgono un ruolo importante nella ricombinazione e nell'espressione dei diversi loci genici. Come vedremo più avanti, nei geni che codificano per le Ig le sequenze che guidano la ricombinazione dei diversi segmenti genici si trovano adiacenti ai segmenti genici codificanti. Sono anche presenti i promotori dei geni V e altri elementi regolatori che agiscono in *cis*, come le regioni di controllo dei

loci, regioni enhancer e soppressorie, che regolano l’espressione del gene a livello della sua trascrizione.

Organizzazione dei loci genici per il TCR

Nella configurazione germinativa, ciascun locus codificante per il TCR presenta un’organizzazione molto simile a quella dei loci codificanti per le Ig descritti sopra, con un cluster localizzato all’estremità 5′composto da numerosi segmenti genici V, seguiti dai segmenti genici D (solo nei loci β e δ) e da un cluster di segmenti genici J, tutti a monte dei geni della regione C (Fig. 8-6). Nell’uomo, il locus β contiene circa 50 segmenti genici V, 2 D e 12 J e il locus α 45 segmenti genici V e 50 J. I loci γ e δ possiedono nel complesso un numero di segmenti genici inferiore rispetto ai loci α e β, con un totale di soli 7 segmenti genici V. A monte di ogni segmento genico V c’è un esone che codifica un peptide leader e a monte di ogni esone leader c’è un promotore per ogni gene V. Nelle catene β e δ del TCR, il dominio V è codificato dai segmenti genici V, D e J mentre nelle catene α e γ del TCR il dominio V è codificato dai soli segmenti genici V e J. Nell’uomo esistono 2 geni C in ciascuno dei loci per la catena β e per la catena γ del TCR, ciascuno dei quali possiede il proprio cluster di segmenti genici J localizzato all’estremità 5′ e un solo gene C in ciascun locus di α e γ. Ciascuna regione C è composta da 4 esoni codificanti per il dominio immunoglobulinico della regione extracellulare C, una breve regione cerniera, il segmento transmembrana e la coda citoplasmatica.

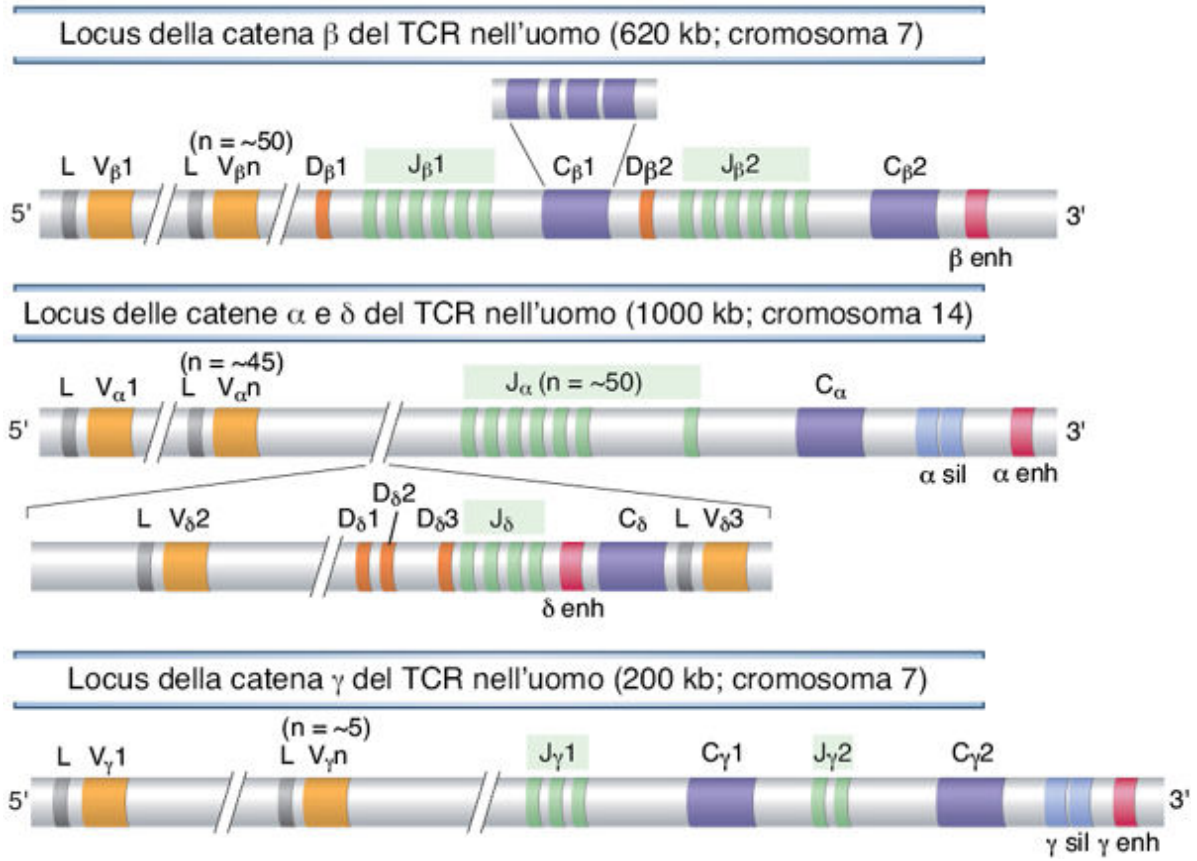


FIGURA 8-6 Organizzazione dei loci TCR umani nella configurazione germinativa. Vengono mostrati i loci delle catene β, α, γ e δ del TCR nell'uomo. Gli esoni e gli introni non sono riprodotti in scala e non vengono mostrati gli pseudogeni non funzionali. Ogni gene costante (C) è mostrato come singolo riquadro, ma è composto da diversi esoni, come illustrato per Cβ1. I segmenti genici sono indicati come: L, leader (comunemente definito sequenza segnale); V, variabile; D, diversità; J, giunzione; C, costante; enh, enhancer; sil, silencer (sequenze che regolano la trascrizione del gene per il TCR).

Nella Figura 8-5, *B* si può notare la correlazione tra i segmenti genici codificanti per il TCR e le corrispondenti porzioni proteiche. Come per le Ig, i domini V e C del TCR assumono una struttura terziaria di tipo Ig: quindi anche il TCR è un membro della superfamiglia delle Ig.

Ricombinazione V(D)J

L'organizzazione dei loci per le Ig e il TCR nella configurazione germinativa, così come è stata finora descritta, è presente in tutti i tipi cellulari dell'organismo. In tale configurazione, i geni non possono essere trascritti in mRNA funzionanti. I recettori per l'antigene funzionanti

vengono prodotti solo nei linfociti B e T dopo il riarrangiamento del DNA che porta alla fusione casuale di segmenti genici V, D e J.

Il processo di ricombinazione V(D)J che avviene in qualsiasi locus per le Ig o per il TCR prevede la scelta casuale di un gene V, un segmento J e un segmento D (quando presente) e il loro riarrangiamento a formare un singolo esone V(D)J che codificherà per la regione variabile di un recettore per l'antigene specifico per ogni singolo linfocita (Fig. 8-7). Nei loci per la catena leggera delle Ig e per le catene α e δ del TCR (che mancano dei segmenti genici D) un singolo evento di riarrangiamento unisce casualmente un gene V a un segmento J. Invece, nei loci per le Ig H e per le catene β e δ del TCR (dove sono presenti i segmenti genici D) due distinti eventi di riarrangiamento devono essere effettuati separatamente: il primo ricongiunge un segmento D a un segmento J, il secondo ricongiunge il neoformato segmento DJ a un segmento V. Ogni riarrangiamento prevede una precisa sequenza di reazioni: in primo luogo, la cromatina deve essere aperta in regioni specifiche del cromosoma per rendere accessibili i segmenti genici codificanti per i recettori per l'antigene. Successivamente, i due segmenti genici scelti devono essere avvicinati, a volte anche da posizioni cromosomiche molto distanti. Quindi, alle terminazioni codificanti dei due segmenti genici devono essere effettuati dei tagli alla doppia elica del DNA, devono essere inseriti dei nucleotidi e infine le terminazioni così processate devono essere ricongiunte a formare il gene per il recettore di quel particolare clone (cioè esclusivo e diverso per ogni cellula) che possa essere efficientemente trascritto. Le regioni C si posizionano a valle degli esoni V(D)J riarrangiati, separate da questi ultimi dagli introni J-C nella linea germinale. L'esone riarrangiato viene trascritto a formare un RNA nucleare primario. Il successivo processo di splicing dell'RNA unirà l'esone leader, l'esone V(D)J e l'esone per la regione C, formando così un mRNA che, a livello ribosomiale, può essere tradotto a formare una delle catene del recettore per l'antigene. La generazione di diverse combinazioni dei segmenti genici V, D e J e l'addizione o la rimozione di nucleotidi alle loro giunzioni contribuiscono all'enorme diversificazione dei recettori per l'antigene (vedi più avanti).

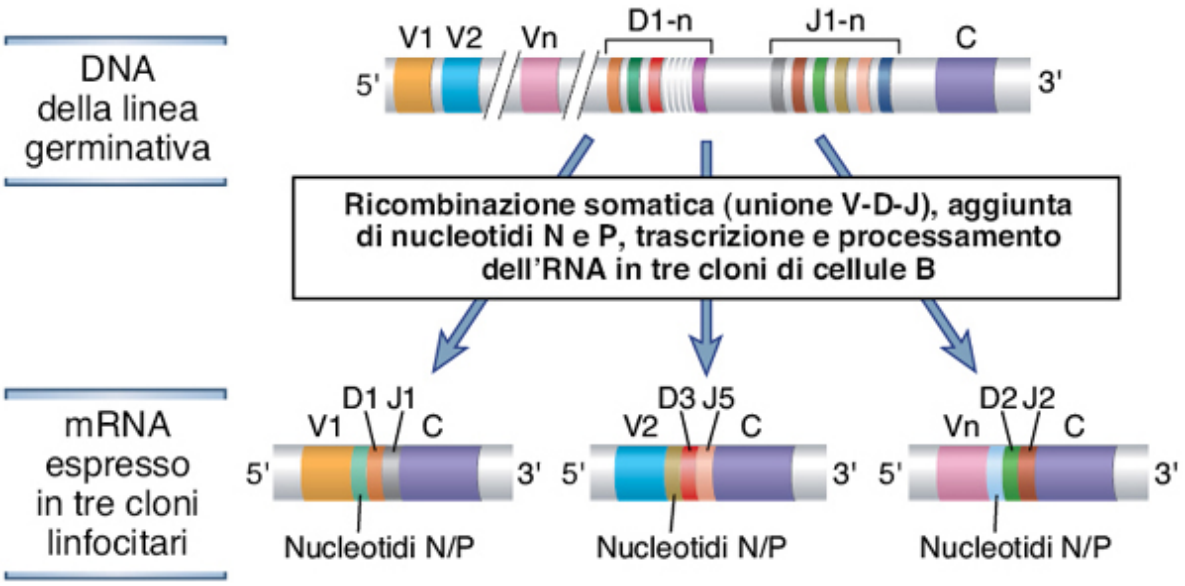


FIGURA 8-7 Diversificazione dei geni per il recettore per l'antigene. Dallo stesso DNA in linea germinativa è possibile generare sequenze di DNA ricombinate e quindi mRNA, che differiscono per le giunzioni V-D-J. Nell'esempio mostrato, tre distinti mRNA relativi a recettori per l'antigene sono stati ottenuti dallo stesso DNA tramite l'uso di diversi segmenti genici e l'aggiunta di nucleotidi alle giunzioni.

Sequenze che orchestrano la ricombinazione V(D)J

Le proteine responsabili del processo di ricombinazione V(D)J nei linfociti agiscono riconoscendo specifiche sequenze di DNA definite sequenze segnale della ricombinazione **(Recombination Signal Sequences, *RSS*), *localizzate all'estremità 3′ dei segmenti genici V, all'estremità 5′ dei segmenti genici J e ai due estremi dei segmenti genici D*** (Fig. 8-8, *A*). Le RSS sono costituite da una sequenza altamente conservata di 7 nucleotidi (di solito CACAGTG), definita *eptamero*, localizzata vicino alla sequenza codificante, seguita da uno spaziatore di 12 o 23 nucleotidi non conservati e da una seconda sequenza altamente conservata di 9 nucleotidi ricchi in AT, definita *nonamero*. Gli intervalli di 12 e 23 nucleotidi corrispondono rispettivamente a uno o due giri completi di elica di DNA e presumibilmente portano due eptameri in posizione tale da poter essere simultaneamente accessibili agli enzimi di ricombinazione.

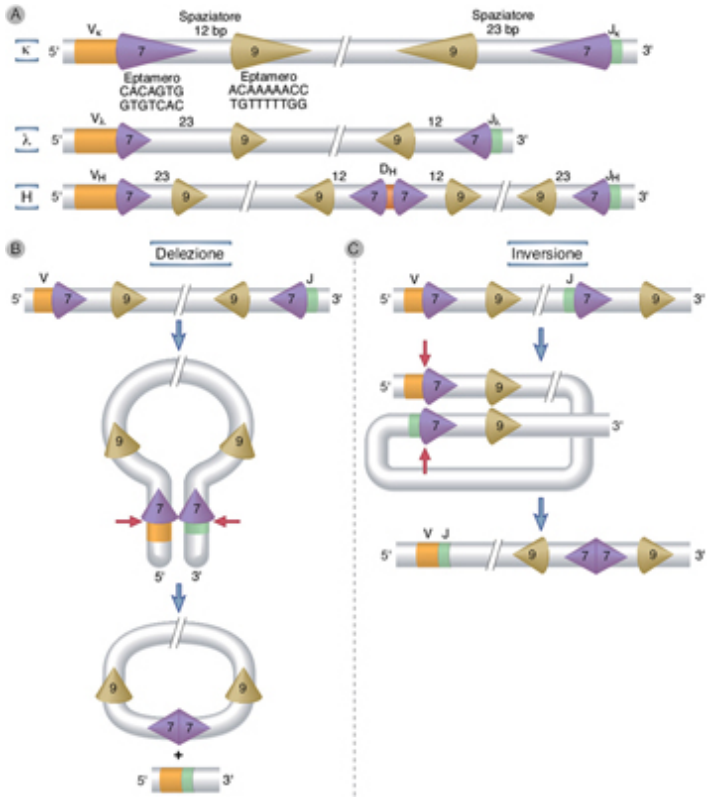


FIGURA 8-8 Ricombinazione V(D)J. La figura illustra le sequenze di DNA e i meccanismi coinvolti nella ricombinazione dei loci dei geni per le Ig. Sequenze e meccanismi analoghi si applicano alle ricombinazioni nei loci per il TCR. **A.** Sequenze eptameriche (7 bp) e nonameriche (9 bp) conservate, separate da spaziatori di 12 o 23 bp, sono adiacenti ai segmenti genici V e J (per i loci κ e λ) o ai segmenti genici V, D e J (nel locus della catena H). La ricombinasi V(D)J riconosce queste sequenze-segnale per la ricombinazione e ricongiunge i diversi esoni. **B, C.** La ricombinazione degli esoni V e J può avvenire per delezione del DNA interposto e legame dei segmenti genici V e J **(B)** o, se la RSS è localizzata all'estremità 3' di un segmento J, tramite inversione del DNA seguita da giunzione di segmenti genici adiacenti (**C**). Le *frecce rosse* indicano i punti in cui le sequenze in linea germinativa sono tagliate prima di essere ricongiunte ad altri segmenti genici per le Ig o il TCR.

Durante la ricombinazione V(D)J vengono effettuati dei tagli nella doppia elica tra l'eptamero delle RSS e le sequenze V, D o J adiacenti. Durante la ricombinazione V-J della catena leggera delle Ig, per esempio, i tagli verranno effettuati all'estremità 3′ di un segmento V e a quella 5′ di un segmento J. Il frammento di DNA a doppia elica tagliato, che contiene le parti terminali dei segnali (a loro volta contenenti l'eptamero e il resto delle RSS) viene rimosso sotto forma di anello, permettendo quindi alle estremità dei segmenti genici codificanti per V e J di congiungersi (vedi Fig. 8-8, *B*). Va notato comunque come, in alcuni segmenti genici V, specialmente nel locus κ delle Ig, le RSS sono localizzate all'estremità 3' di un Vκ e di un Jκ

e non possono pertanto porsi l'una di fronte all'altra. In questi casi, il DNA intermedio viene invertito, i segmenti genici V e J vengono opportunamente allineati e le RSS così congiunte non vengono eliminate, bensì conservate nel cromosoma (vedi Fig. 8-8, *C*). La maggior parte dei riarrangiamenti per Ig e TCR avviene per delezione; l'inversione è la base di una percentuale che può arrivare al 50% dei riarrangiamenti totali nel caso del locus per le catene κ delle Ig. La ricombinazione si verifica tra due segmenti genici soltanto se uno dei due segmenti è affiancato da uno spaziatore di 12 nucleotidi e l'altro da uno di 23 nucleotidi, definendo la cosiddetta "regola 12/23". Un segmento genico codificante dotato di una RSS con un distanziatore che copre un singolo giro dell'elica di DNA potrà pertanto ricombinarsi sempre e solo con un altro segmento genico codificante dotato di una RSS con un distanziatore che deve necessariamente coprire due giri dell'elica di DNA. Il tipo di RSS (un giro o due giri di elica) assicura che vengano ricombinati solo gli appropriati segmenti genici. Per esempio, nel locus della catena pesante delle Ig, le RSS affiancate ai segmenti genici sia V sia J hanno spaziatori di 23 nucleotidi (corrispondenti a due giri di elica) e quindi non possono legarsi tra loro; deve prima avvenire la ricombinazione D-J e solo successivamente la ricombinazione V-DJ, essendo ciò possibile poiché i segmenti genici D sono affiancati su ambo i lati da spaziatori di 12 nucleotidi, permettendo il legame D-J e poi quello V-DJ. Le RSS sono presenti solo nei geni per le Ig e il TCR. Di conseguenza, la ricombinazione V(D)J può avvenire in questi ma non in altri geni.

Una delle conseguenze della ricombinazione V(D)J è che le sequenze promotrici localizzate al 5′ dei geni V vengono portate in contiguità a sequenze enhancer situate a valle, negli introni J-C e al 3′ dei geni della regione C (Fig. 8-9). Tali sequenze enhancer spingono al massimo la trascrizione delle sequenze promotrici dei geni V, svolgendo quindi un ruolo essenziale nella trascrizione ad alta velocità dei geni V riarrangiati nei linfociti. Poiché nei geni per le Ig e il TCR dei linfociti B e T avvengono molteplici eventi di ricombinazione del DNA e poiché questi geni diventano trascrizionalmente attivi solo dopo la loro ricombinazione, i geni appartenenti ad altri loci possono essere qui erroneamente traslocati e trascritti in modo abnorme, come avviene nei tumori dei linfociti B e T. Tali traslocazioni cromosomiche si associano frequentemente a un'aumentata

trascrizione degli oncogeni; si ritiene che questo fenomeno rappresenti uno dei fattori eziologici dello sviluppo dei tumori linfoidi.

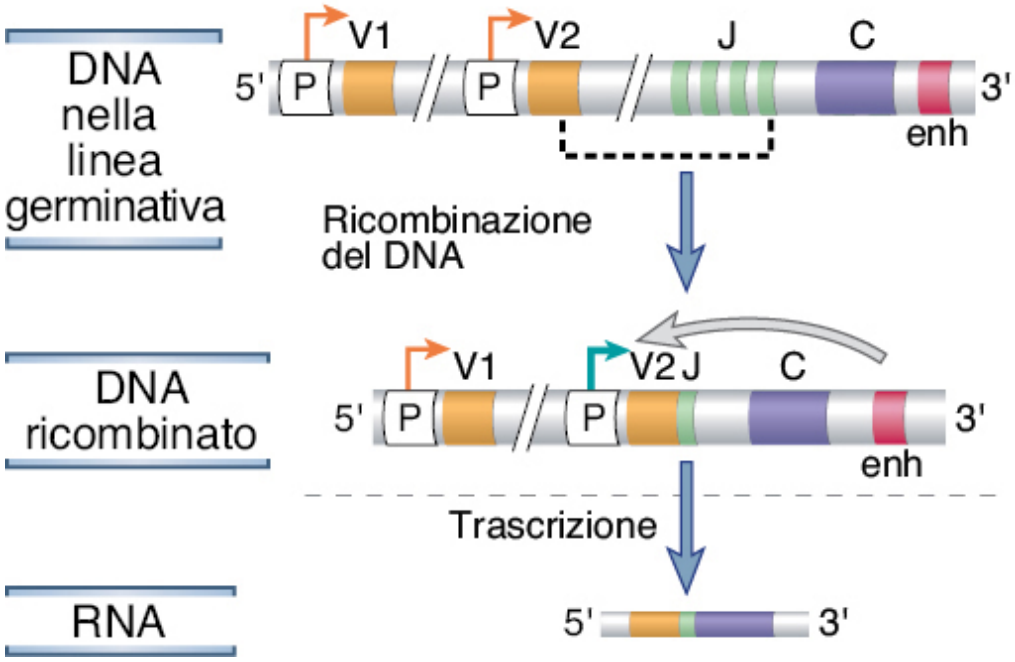


FIGURA 8-9 Regolazione trascrizionale dei geni per le Ig. La ricombinazione V-D-J porta i promotori (*indicati come P*) adiacenti all'enhancer (enh). Quest'ultima promuove la trascrizione del gene V riarrangiato (V2, *il cui promotore attivo è indicato con una freccia verde*). Molti di questi geni sono dotati di una sequenza "enhancer" nell'introne J-C e di un altro al 3' della regione C. Solo quest'ultimo è mostrato in questa figura.

Meccanismi di ricombinazione V(D)J

Il riarrangiamento dei geni per le Ig e il TCR rappresenta una particolare forma di ricombinazione non omologa del DNA, regolata dall'attività coordinata di diversi enzimi, alcuni dei quali si ritrovano solo nei linfociti in corso di maturazione, mentre altri sono ubiquitari, riconducibili a enzimi di riparazione del DNA. Per quanto il meccanismo di ricombinazione V(D)J sia abbastanza ben caratterizzato (Fig. 8-8), il meccanismo attraverso cui specifici loci sono resi accessibili agli enzimi di ricombinazione non sono stati ancora chiariti. È probabile che nei linfociti in corso di maturazione l'accessibilità dei loci dei geni per le Ig e il TCR sia regolata da diversi meccanismi, incluse le modificazioni epigenetiche della struttura della cromatina e dello stesso DNA, come già descritto, e dall'attività di trascrizione basale degli stessi loci genici.

Nel processo di ricombinazione V(D)J si possono distinguere quattro eventi distinti che avvengono in ordine sequenziale (Fig. 8-10).

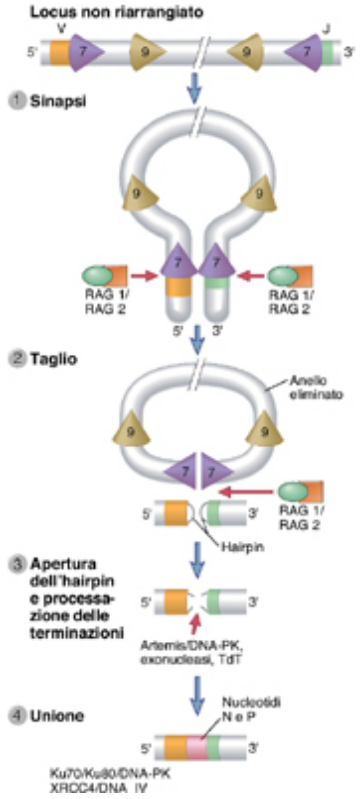


FIGURA 8-10 Sequenza di eventi nel processo di ricombinazione V(D)J. La sinapsi e il taglio del DNA tra eptamero e segmento codificante sono mediati da Rag-1 e Rag-2. La terminazione codificante della hairpin viene aperta dall'endonucleasi Artemis e le terminazioni generate dal taglio sono ricongiunte da un apparato di ricongiunzione non omologa presente in tutti i tipi cellulari. Si noti che due filamenti di DNA sono mostrati negli hairpin ma non in altre illustrazioni schematiche dei geni.

1. ***Sinapsi***: parti del cromosoma sono rese accessibili ai componenti del processo di ricombinazione; due distinti segmenti genici codificanti e le loro RSS adiacenti vengono posti in contatto grazie alla formazione di strutture ad anello e vengono mantenuti in questa posizione per i successivi eventi di taglio, processamento e ricongiunzione.
2. ***Taglio***: mediante reazione enzimatica, alle giunzioni tra RSS e sequenze codificanti si operano i tagli della doppia elica del DNA; questo processo è specifico dei linfociti. Due proteine codificate da geni specifici per cellule linfoidi, definite **geni attivanti la ricombinazione 1 e 2 (*Recombination-activating gene 1 and 2, RAG1* e *RAG2*)**, si

assemblano a formare un complesso contenente due molecole di ciascuna proteina, conosciuto anche come **ricombinasi V(D)J,** che svolge un ruolo essenziale nel processo di ricombinazione V(D)J. Agendo come un'endonucleasi di restrizione, la proteina Rag-1 riconosce e taglia le sequenze di giunzione tra eptameri e segmenti genici codificanti. È da notare che Rag-1 diventa enzimaticamente attiva solo quando viene complessata a Rag-2. Quest'ultima è inoltre in grado di favorire l'interazione del tetramero Rag-1/Rag-2 con altre proteine quali i fattori di accessibilità che regolano, in alcune fasi della maturazione linfocitaria, l'accesso delle proteine regolatrici ai loci "smascherati" del gene per il recettore per l'antigene. Le proteine Rag-1 e Rag-2 contribuiscono anche a mantenere uniti i segmenti genici durante il processo di ripiegamento del cromosoma (sinapsi). Qui la Rag-1 taglia una delle eliche di DNA tra l'estremità codificante e l'eptamero. La terminazione 3'-OH dell'estremità codificante così generata si lega covalentemente all'altro filamento di DNA mediante legame fosfodiesterico, formando una struttura a forcina (*hairpin*). L'altra estremità (incluso l'eptamero e il resto della RSS) non si organizza a hairpin, originando piuttosto una terminazione troncata a doppio filamento che non viene ulteriormente processata. Questa rottura del doppio filamento fa sì che l'hairpin chiusa di un segmento codificante si trovi di fronte all'hairpin chiusa dell'altra estremità codificante mentre, contemporaneamente, le due corrispondenti estremità troncate si posizionano in postazioni ravvicinate. Le proteine Rag-1 e Rag-2, oltre a introdurre rotture nel doppio filamento, mantengono in posizione le estremità hairpin e le estremità troncate prima che esse vengano processate e ricongiunte.

I geni *RAG* sono specificamente attivati solo durante la maturazione delle cellule linfoidi, principalmente nelle fasi G_0 e G_1 del ciclo cellulare, mentre rimangono silenti durante la fase proliferativa. Si ritiene che ciò avvenga per limitare gli eventi di taglio e ricombinazione del DNA in queste specifiche fasi e minimizzare il rischio di rotture inappropriate del DNA durante la mitosi. Topi privi dei geni *Rag1* o *Rag2* (topi "knockout *Rag*") non riescono a produrre linfociti B o T. Inoltre, il deficit di Rag-1 o Rag-2 rappresenta una rara causa di SCID in cui si riscontra assenza di tutte le popolazioni linfocitarie.

3. ***Apertura delle hairpin e processamento*:** le estremità codificanti tagliate vengono modificate dall'aggiunta o dalla rimozione di nucleotidi, al fine di aumentare il livello di diversificazione. Dopo i tagli della doppia elica, le strutture ad hairpin devono essere aperte (linearizzate) a livello delle giunzioni delle sequenze codificanti per permettere l'aggiunta di nucleotidi che, come sopra menzionato, garantiranno una maggiore diversificazione. **Artemis** è un'endonucleasi il cui compito è proprio quello di aprire le hairpin alla terminazione delle sequenze codificanti. In assenza di Artemis, le hairpin non si aprono e non si generano di conseguenza linfociti B e T maturi. Analogamente alle mutazioni di *RAG1* o *RAG2*, anche le mutazioni di Artemis sono una rara causa di SCID, (vedi Cap. 21). Un enzima specifico per i linfociti, noto come *deossinucleotidiltransferasi terminale* (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase*, TdT) ha invece il compito di aggiungere basi alle terminazioni di DNA neoformate (vedi più avanti).
4. ***Unione***: le estremità codificanti tagliate e le estremità segnale si avvicinano e si ricongiungono mediante il processo di riparazione delle rotture del doppio filamento; questo processo, al quale partecipano diversi fattori ubiquitari, è presente in tutte le cellule e viene definito *unione delle estremità non omologhe*. Ku70 e Ku80 sono due proteine che ricongiungono le terminazioni di DNA e reclutano la subunità catalitica dell'enzima DNA-PK (*DNA-dependent Protein Kinase*), in grado di riparare la doppia elica di DNA. Questo enzima è difettivo nei topi portatori di mutazione che causano le immunodeficienze gravi combinate (*Severe Combined ImmunoDeficiencies*, SCID). Inoltre, le mutazioni del gene codificante questo enzima sono state riscontrate anche in pazienti con SCID (vedi Cap. 21). Come i topi che mancano della *Rag*, i topi *SCID* non riescono a produrre linfociti maturi. L'enzima DNA-PK fosforila e attiva Artemis, che, come detto, è coinvolta nel processamento delle estremità codificanti. Queste vengono ricongiunte dalla DNA-ligasi IV e da XRCC4, una subunità non catalitica ma essenziale per l'attività della ligasi.

Diversificazione dei linfociti B e T

L'ampia varietà del repertorio dei linfociti B e T è generata dal riarrangiamento casuale dei geni per le Ig e il TCR e dall'aggiunta o dalla rimozione di sequenze addizionali alle estremità dei segmenti genici riarrangiati. Numerosi meccanismi genetici contribuiscono a questa diversificazione e la relativa importanza di ogni meccanismo varia tra i diversi loci per i recettori per l'antigene (Tab. 8-1).

TABELLA 8-1 Diversi meccanismi contribuiscono alla generazione della diversificazione nei geni Ig e TCR

	Ig			TCR αβ		TCR γδ	
Meccanismo	**Catena pesante**	**κ**	**λ**	**α**	**β**	**γ**	**δ**
Segmenti variabili (V)	45	35	30	45	50	5	2
Segmenti della diversità (D)	23	0	0	0	2	0	3
Segmenti D letti in tutti e tre gli schemi di lettura	Rari	—		—	Frequenti	—	Frequenti
Diversificazione nella regione N	V-D, D-J	Nessuna		V-J	V-D, D-J	V-J	V-D1, D1-D2, D1-J
Segmenti di giunzione (J)	6	5	4	55	12	5	4
Repertorio potenziale complessivo di diversità giunzionale	~10^{11}			~10^{16}		~10^{16}	

Il numero potenziale di recettori per l'antigene con diversità giunzionale è molto maggiore di quello che potrebbe essere generato solo dalle combinazioni dei segmenti genici V, D e J. Si noti che, sebbene il limite teorico massimo di proteine Ig e TCR che possono essere espresse sia molto grande, si stima che ogni individuo contenga all'incirca 10^7 cloni di linfociti B e T con specificità e recettori distinti; in altre parole, solo una frazione del potenziale repertorio può in realtà essere espressa.

- ***Diversità combinatoriale. La ricombinazione V(D)J coinvolge molteplici segmenti genici della linea germinativa che possono combinarsi casualmente, producendo diversi recettori.*** Il numero massimo possibile di combinazioni di questi segmenti genici è il prodotto del numero di segmenti genici di V, J e (se presente) D in ogni locus. Ne deriva che l'entità della diversità combinatoriale che può essere generata in ogni locus riflette il numero di segmenti genici dei loci germinativi di V, J e D. La diversità combinatoriale è ulteriormente aumentata dalla giustapposizione di due regioni V diverse, generate in modo casuale (cioè nell'appaiamento di V_H e V_L nelle Ig e V_α e V_β nel TCR). Quindi, la diversificazione totale è teoricamente il prodotto della diversità combinatoriale di ognuna delle due catene leggere associate. Comunque, il reale grado di diversificazione presente in ogni individuo è probabilmente molto inferiore a quello ipotizzato. Ciò si verifica perché non tutte le ricombinazioni dei segmenti genici hanno la stessa probabilità di realizzarsi e non tutte le coppie di catene pesanti e leggere di Ig o di catene α e β del TCR riescono a formare recettori per

l’antigene funzionali. Tuttavia, dato che il numero di segmenti genici V, J e D in ogni locus è limitato (vedi Tab. 8-1), il numero massimo possibile di combinazioni è nell’ordine delle migliaia, una stima di molto inferiore alla reale diversificazione dei recettori per l’antigene presente nei linfociti maturi.

- ***Diversità giunzionale. Il più ampio contributo alla diversificazione dei recettori per gli antigeni è dato dalla rimozione o dall’aggiunta di nucleotidi tra le terminazioni dei segmenti genici V e D, D e J o V e J al momento della loro ricongiunzione***. Questo processo avviene attraverso la rimozione, a opera di endonucleasi, di nucleotidi dalla sequenza germinativa alle estremità dei segmenti genici che si ricombinano. Inoltre, nuove sequenze nucleotidiche (non presenti nella configurazione germinativa) possono essere aggiunte nei siti di giunzione (Fig. 8-11). Come già descritto, i segmenti genici codificanti (per esempio V e J), una volta tagliati dalla Rag-1, formano strutture hairpin le cui estremità sono spesso scisse asimmetricamente da Artemis, cosicché un tratto di DNA rimane più lungo dell’altro. Il tratto di DNA più corto deve essere esteso con nucleotidi complementari a quelli del tratto di DNA più lungo prima della giunzione dei due segmenti genici. Il tratto di DNA più lungo serve da stampo per l’aggiunta di brevi segmenti nucleotidici detti nucleotidi P. Tale processo introduce nuove sequenze nella giunzione V-D-J. Un ultimo meccanismo di diversificazione giunzionale è legato all’aggiunta casuale di un massimo di 20 nucleotidi casuali definiti nucleotidi N (Fig. 8-11). La diversificazione della regione N è più comune nella catena pesante delle Ig e nelle catene β e γ del TCR che nelle catene κ o λ delle Ig. L’aggiunta di nucleotidi N è mediata dall’enzima transferasi terminale di deossinucleotidi (***Terminal deoxynucleotidyl Transferase***, **TdT)**. In topi knockout, cioè resi deficienti per questo enzima, il repertorio linfocitario B e T è caratterizzato da un indice di diversificazione inferiore rispetto a topi normali. L’aggiunta di nucleotidi P ed N nei siti di ricombinazione può provocare slittamenti dello schema di lettura che in teoria possono generare codoni di stop con una frequenza di due su tre eventi di giunzione (se il numero totale delle basi aggiunte non è un multiplo di tre). I geni così riarrangiati non

potranno codificare per proteine funzionali, ma tale inefficienza è il prezzo da pagare per generare il massimo della diversificazione.

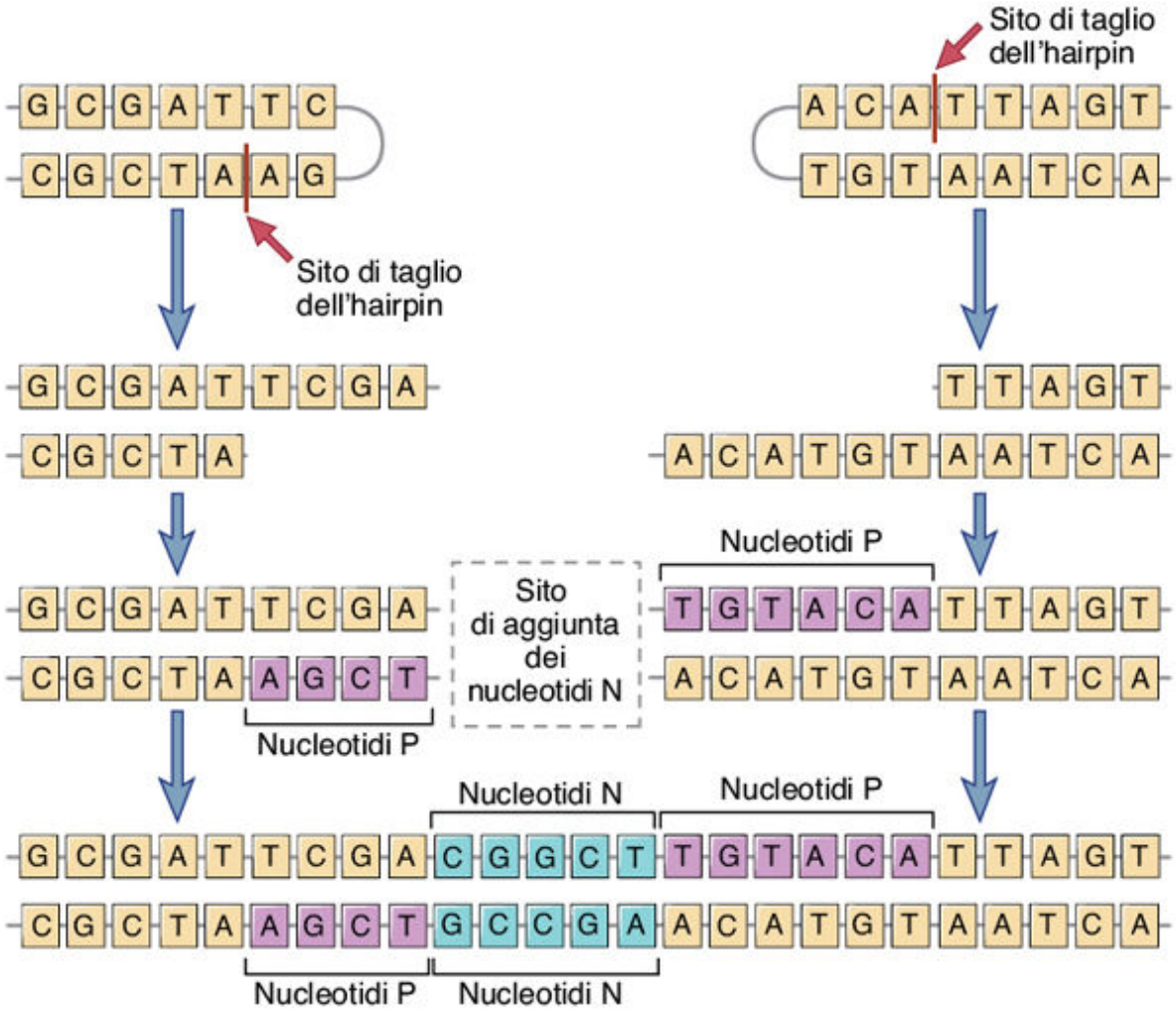


FIGURA 8-11 Diversificazione giunzionale. Durante il ricongiungimento dei segmenti dei diversi geni, l'aggiunta o la rimozione di nucleotidi può portare alla generazione di nuovi nucleotidi e sequenze di aminoacidi nel punto di giunzione. I nucleotidi (*sequenze P*) possono essere aggiunti alle hairpin tagliate asimmetricamente. Altri nucleotidi (*regioni N*) possono essere aggiunti ai punti di giunzioni dall'enzima TdT. Queste aggiunte danno origine a nuove sequenze che non sono presenti nella configurazione germinativa.

A causa della diversità giunzionale, gli anticorpi e i TCR mostrano la massima variabilità in corrispondenza delle giunzioni delle regioni V e C che formano la terza regione ipervariabile (CDR3) (vedi Fig. 8-5). Queste regioni sono anche le più importanti nella determinazione della specificità del legame dell'antigene (vedi Capp. 5 e 7). Infatti, a causa della diversità giunzionale, il numero delle diverse sequenze aminoacidiche presenti nelle

regioni CDR3 delle Ig e dei TCR è nettamente maggiore del numero che può essere codificato dai segmenti genici presenti nella linea germinativa. Così, la diversificazione dei recettori è concentrata nelle regioni che sono più importanti per il legame con l'antigene.

Il reale numero di recettori per l'antigene espressi dai linfociti B e T di ogni individuo è nell'ordine di 10^7, benché il numero teorico di Ig e TCR che possono essere prodotti sia enorme (vedi Tab. 8-1). Questo probabilmente riflette il fatto che molti recettori, generati da ricombinazioni casuali del DNA, non superano i processi selettivi necessari per la maturazione.

Un'applicazione clinica basata sulle conoscenze relative alla diversità giunzionale è la determinazione della clonalità dei tumori linfoidi che si originano da linfociti B o T. Questo test di laboratorio viene comunemente impiegato per identificare tumori monoclonali e per differenziarli dalle espansioni policlonali. Siccome ogni clone linfocitario esprime un'unica regione CDR3, la sequenza di nucleotidi nel sito di ricombinazione V(D)J funziona come marcatore clonale specifico. Così, attraverso il saggio di reazione a catena della polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), si può determinare la lunghezza e la sequenza delle regioni giunzionali dei geni per le Ig o il TCR in diversi linfociti B e T e stabilire se si tratta dell'espansione di un singolo clone (segno di neoplasia) o di cloni diversi (indice di proliferazione non neoplastica). Inoltre, la PCR può essere utilizzata come metodo sensibile per rilevare la presenza di rare cellule tumorali presenti nel sangue o nei tessuti.

Con questi presupposti, procederemo ora alla descrizione dello sviluppo dei linfociti B e quindi della maturazione dei linfociti T.

SVILUPPO DEI LINFOCITI B

I principali eventi che si verificano nel corso della maturazione dei linfociti B sono il riarrangiamento e l'espressione dei geni delle Ig che avvengono secondo un ordine ben preciso: la selezione e la proliferazione dei linfociti B che esprimono il pre-recettore per l'antigene e la successiva selezione del repertorio dei linfociti B maturi. Durante lo sviluppo

embrionale i linfociti B si sviluppano nel fegato fetale a partire da specifici precursori; dopo la nascita, vengono invece generati nel midollo osseo. La maggior parte dei linfociti B deriva da progenitori adulti midollari che inizialmente non esprimono le Ig. Quindi, questi progenitori daranno origine a linfociti B immaturi che esprimono le IgM di membrana e lasciano il midollo per continuare la loro maturazione soprattutto nella milza. Qui le cellule che matureranno a linfociti B follicolari esprimono sulla membrana le IgM e le IgD e acquisiscono la capacità di ricircolare andando così a popolare tutti gli organi linfoidi secondari, soprattutto i follicoli linfoidi dove potranno riconoscere e rispondere agli antigeni. Nell'uomo lo sviluppo di un linfocita B maturo a partire da un precursore linfoide impiega circa 2-3 giorni.

Stadi dello sviluppo dei linfociti B

Nel corso della loro maturazione, i linfociti B passano attraverso stadi ben distinti, ognuno caratterizzato da specifici marcatori di superficie e dall'espressione di uno specifico profilo di Ig (Fig. 8-12). Di seguito descriviamo gli eventi che caratterizzano le fasi principali di questo processo.

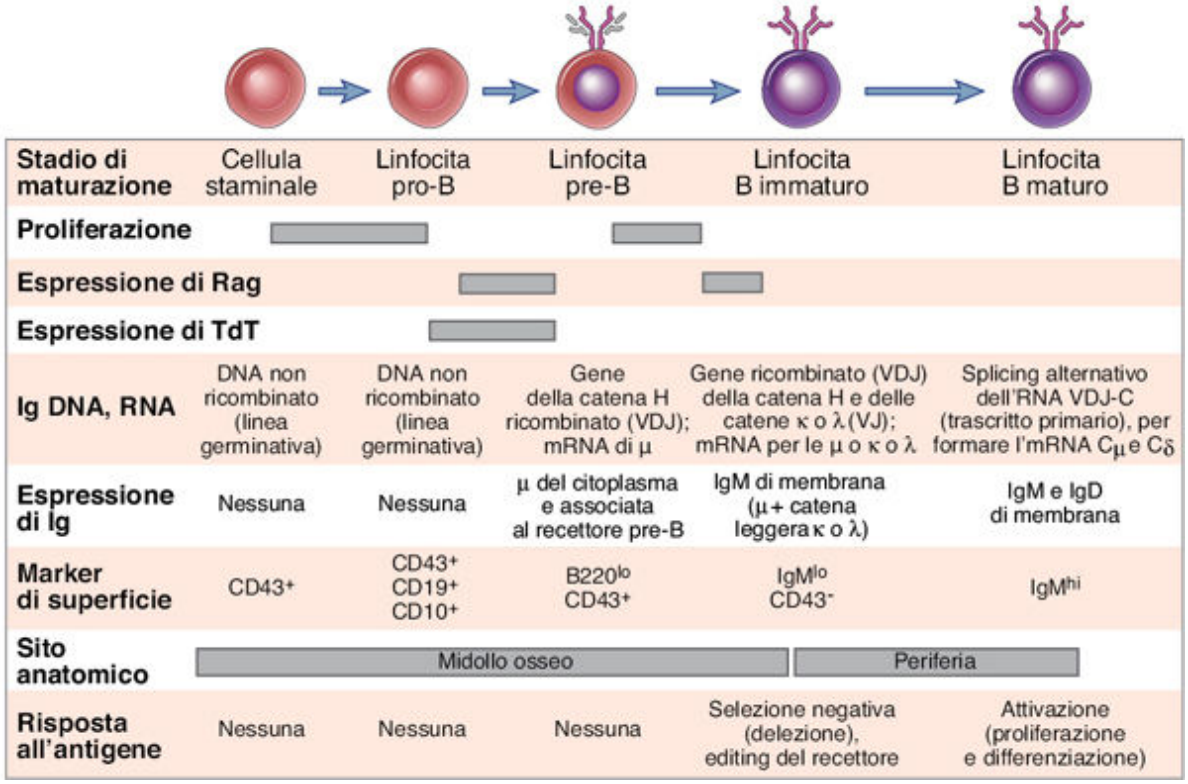


FIGURA 8-12 Stadi della maturazione dei linfociti B. Vengono qui illustrati gli eventi corrispondenti a ogni stadio di maturazione dei linfociti B, dalla cellula staminale del midollo osseo al linfocita B maturo. Oltre a quelli mostrati, vengono normalmente utilizzati numerosi altri marcatori di superficie per identificare i diversi stadi di maturazione dei linfociti B.

Gli stadi pro-B e pre-B nello sviluppo dei linfociti B

Il primo progenitore midollare orientato verso la linea B è chiamato cellula pro-B. I linfociti pro-B non producono Ig ma possono essere distinti dalle altre cellule immature per l'espressione di molecole di superficie tipiche dei linfociti B, come CD19 e CD10. In questa fase sono espresse le proteine Rag-1 e Rag-2 che mediano la prima ricombinazione dei geni del locus della catena pesante delle Ig. Questa ricombinazione avvicina un segmento D a un segmento J, con delezione del DNA interposto (Fig. 8-13, *A*). I rimanenti segmenti genici D, in posizione 5′ rispetto al segmento D riarrangiato, così come i rimanenti segmenti genici J, in posizione 3′ rispetto al segmento J riarrangiato, vengono eliminati nel corso di questa ricombinazione (per esempio da D1 e da J2 a J6 nella Figura 8-13, *A*). Dopo la ricombinazione D-J, uno dei molti geni V è ricongiunto al segmento DJ neoformato, originando un esone VDJ riarrangiato. In questo stadio, anche

tutti i segmenti genici V e D compresi tra i geni V e D riarrangiati vengono rimossi. La ricombinazione di V con DJ nel locus della catena H delle Ig si verifica solo nei precursori dei linfociti B ed è un evento critico nell'espressione delle Ig, poiché solo il gene V riarrangiato sarà successivamente trascritto. L'enzima TdT, che catalizza l'aggiunta casuale dei nucleotidi N giunzionali, è espresso più abbondantemente durante lo stadio pro-B, quando si verifica la ricombinazione VDJ al locus delle Ig H. I livelli di TdT si riducono prima che la ricombinazione V-J del gene per la catena leggera sia completa. Quindi, la diversità giunzionale attribuibile all'aggiunta dei nucleotidi N nel riarrangiamento delle catene pesanti è maggiore che in quello delle catene leggere.

FIGURA 8-13 Ricombinazione ed espressione dei geni delle catene pesanti e leggere delle Ig. La figura mostra la sequenza di eventi di ricombinazione del DNA e di espressione genica per la catena pesante μ (**A**) e la catena leggera κ delle Ig (**B**). In **A,** la regione variabile (V) della catena pesante μ è codificata dagli esoni V1, D2 e J1. In **B,** la regione V della catena κ è codificata dagli esoni V1 e J1.

Gli esoni della regione C delle catene pesanti restano separati dal complesso VDJ da una regione di DNA contenente il segmento distale di J e l'introne J-C. Il gene per la catena pesante riarrangiato è trascritto per

produrre un trascritto primario che include il complesso VDJ riarrangiato e gli esoni C_μ. Questo RNA nucleare viene tagliato a valle di una o di due sequenze di poliadenilazione e diverse adenine (definite code poli-A) sono aggiunte all'estremità 3'. Questo trascritto andrà incontro a splicing con rimozione degli introni e ricongiunzione degli esoni. Nel caso dell'RNA della catena μ, vengono rimossi gli introni tra l'esone principale e l'esone VDJ, tra l'esone VDJ e il primo esone del locus C_μ e tra ognuno degli esoni della successiva regione costante di C_μ, dando così origine a un mRNA processato per la catena μ. Se l'RNA deriva da un locus Ig che ha subito un riarrangiamento "produttivo", la traduzione dell'RNA della catena μ riarrangiato porta alla sintesi della proteina μ. Per avere un riarrangiamento produttivo (cioè una sequenza di lettura corretta) le basi alle giunzioni devono essere aggiunte o tolte in multipli di tre. Questo garantisce che il gene riarrangiato possa codificare correttamente una proteina Ig. Circa la metà dei linfociti pro-B riesce a portare a termine un riarrangiamento del locus Ig H produttivo su almeno un cromosoma e può quindi produrre la catena μ; solo queste cellule sopravvivono e si differenziano ulteriormente.

Una volta avvenuto un riarrangiamento Ig μ produttivo, la cellula non viene più identificata come pro-B, poiché la si può ritenere differenziata in linfocita pre-B. I **linfociti pre-B** sono cellule della linea differenziativa B che esprimono la proteina Ig μ, ma che devono ancora riarrangiare i loci per le catene leggere. I linfociti pre-B esprimono la catena μ sulla loro superficie in associazione ad altre proteine, in un complesso detto recettore pre-B che svolge un ruolo importante nella maturazione dei linfociti B.

Recettore pre-B

Il complesso della catena μ con la catena leggera sostitutiva e le proteine Igα e Igβ, che trasducono il segnale, formano il pre-recettore del linfocita B, noto anche come recettore pre-B (*pre-B Cell Receptor, *pre-BCR). La catena m si associa con le proteine λ5 e V, a loro volta definite catene leggere sostitutive poiché strutturalmente omologhe alle catene κ e λ, anche se dotate di una sequenza costante (cioè identica in tutti i linfociti pre-B) che viene sintetizzata solo dai linfociti pro-B e pre-B (Fig. 8-14, *A*). Le Igα e Igβ fanno anch'esse parte del recettore dei linfociti B maturi (vedi Cap. 7). I segnali provenienti dal recettore pre-BCR sono responsabili della massiccia

proliferazione di queste cellule nel midollo osseo. I ligandi del complesso pre-BCR non sono ancora noti; si presume che questo recettore funzioni indipendentemente dal ligando, venendo automaticamente attivato al termine del suo corretto assemblaggio. L'importanza del pre-BCR è illustrata da studi condotti in topi knockout e nei rari pazienti che mostrano un deficit di questo recettore. Nel topo, la delezione del gene per la catena μ o per le catene leggere sostitutive provoca la marcata riduzione del numero di linfociti B maturi, con un blocco della maturazione a livello pro-B.

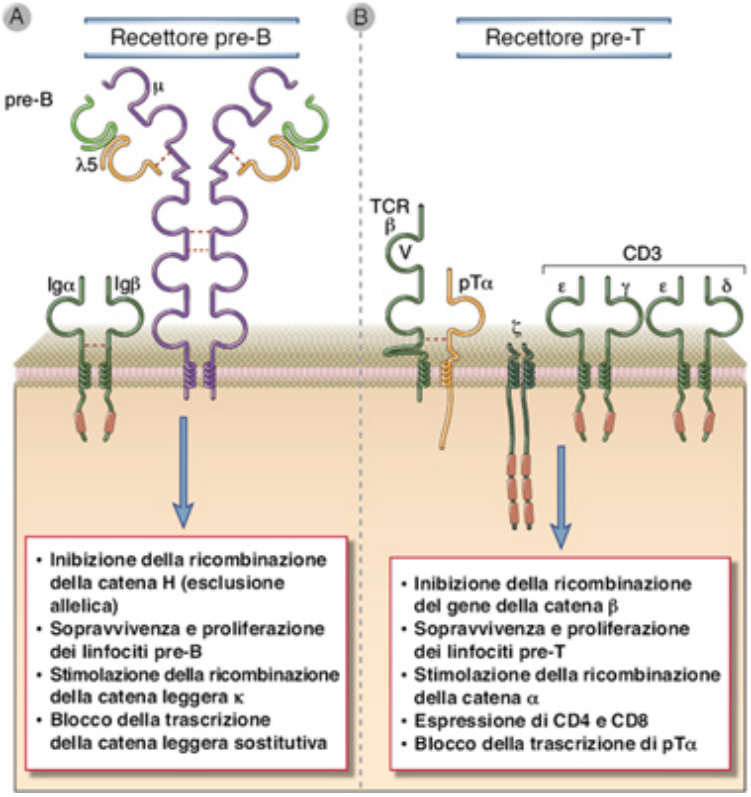


FIGURA 8-14 Recettori pre-B e pre-T. Il recettore pre-B e il recettore pre-T sono espressi durante gli stadi di maturazione pre-B e pre-T dei linfociti. Entrambi i recettori condividono strutture e funzioni simili. **A.** Il recettore pre-B è composto dalla catena pesante μ e da una catena leggera sostitutiva invariabile. Quest'ultima è composta da due proteine, la V pre-B, che è omologa a un dominio V di catena leggera, e la proteina λ5, che è legata in modo covalente alla catena pesante μ tramite un ponte disolfuro. **B.** Il recettore pre-T è composto dalla catena β del TCR e dalla catena invariabile pre-T α (pTα). Il pre-BCR è associato con le proteine Igα e Igβ che fanno parte del complesso BCR nei linfociti B maturi (vedi Cap. 9) e il recettore pre-T è associato alle proteine CD3 e ζ che fanno parte del complesso TCR nei linfociti T maturi (vedi Cap. 7).

L'espressione del pre-BCR costituisce il primo "checkpoint" nella maturazione dei linfociti B. La corretta espressione del pre-BCR è

necessaria alla transizione da pro-B a pre-B e numerose proteine sono coinvolte nel superamento di questa importante fase di controllo. La tirosina chinasi di Bruton (*Bruton's tyrosine kinase*, Btk) è una chinasi che funziona a valle del pre-BCR ed è necessaria per la generazione dei segnali di sopravvivenza, proliferazione e maturazione necessarie per i linfociti pre-B. Nell'uomo, mutazioni del gene *BTK* provocano una patologia definita **agammaglobulinemia legata al cromosoma X (*X-Linked Agammaglobulinemia*, XLA),** che è caratterizzata dalla mancata maturazione dei linfociti B (vedi Cap. 21). In un ceppo di topi chiamato Xid (da immunodeficienza legata al cromosoma X) mutazioni nel gene *btk* determinano un difetto di linfociti B meno grave rispetto all'uomo perché i linfociti pre-B murini esprimono un'altra chinasi simile a Btk, definita Tec, che compensa, almeno parzialmente, il difetto di Btk.

Il pre-BCR regola l'ulteriore riarrangiamento dei geni delle Ig in due modi distinti. In primo luogo, se la ricombinazione del locus della catena pesante in un cromosoma riesce a produrre una proteina μ in grado di formare un pre-BCR, questo recettore produce un segnale che inibisce irreversibilmente il riarrangiamento del locus della catena pesante sul secondo cromosoma. Se, invece, il primo riarrangiamento non risulta produttivo, l'allele delle catene pesanti sul secondo cromosoma può completare il riarrangiamento VDJ al locus Ig H. Così, in ogni clone linfocitario B, almeno un allele per la catena pesante è riarrangiato ed espresso in modo produttivo, mentre l'altro rimane nella sua configurazione germinativa o viene riarrangiato in modo non produttivo. Ne consegue che un linfocita B può codificare proteine della catena pesante delle Ig a partire da uno solo dei due alleli ereditati. Questo fenomeno è detto **esclusione allelica** e aiuta a garantire che ogni linfocita B esprima un solo recettore, mantenendo così la specificità clonale. Se entrambi gli alleli subiscono un riarrangiamento non produttivo del gene Ig H, la cellula in via di sviluppo non è in grado di produrre le catene pesanti, non può generare un segnale di sopravvivenza dipendente dal pre-BCR e va incontro a morte cellulare programmata. L'esclusione allelica della catena pesante delle Ig coinvolge variazioni permanenti della struttura cromatinica a livello del locus della catena pesante che limita l'accessibilità per la ricombinasi V(D)J.

Il secondo meccanismo tramite cui il pre-BCR regola la sintesi del recettore per l'antigene è attraverso la stimolazione del riarrangiamento del

gene per la catena leggera. L'espressione della catena μ non è tuttavia necessariamente richiesta per la ricombinazione dei geni della catena leggera, come dimostrato dalla scoperta che topi knockout per il gene μ sono in grado di iniziare il riarrangiamento genico delle catene leggere in alcuni dei linfociti B in corso di maturazione (che, naturalmente, non sono in grado di esprimere recettori per l'antigene funzionali e di procedere oltre nella loro maturazione). Il pre-BCR contribuisce anche all'inattivazione dell'espressione del gene per la catena leggera sostitutiva quando i linfociti pre-B maturano.

Linfociti B immaturi

Nelle fasi successive allo stadio pre-B, ogni cellula riarrangia inizialmente i geni della catena κ e, se il riarrangiamento viene operato correttamente, esso porterà alla produzione di una catena leggera κ che verrà associata alla catena μ precedentemente sintetizzata per produrre una IgM completa. Se il locus κ non è stato riarrangiato in modo corretto (produttivo), la cellula può riarrangiare il locus λ producendo comunque una IgM completa. (L'induzione del riarrangiamento del gene per la catena λ avviene principalmente quando i recettori contenenti una catena κ sono autoreattivi, vedi più avanti.) I linfociti B che esprimono le IgM sono definiti **linfociti B immaturi**. La ricombinazione del DNA nel locus delle catene κ avviene in modo simile a quello descritto per la catena pesante (vedi Fig. 8-13, *B*). Non esistono segmenti genici D nei loci delle catene leggere e quindi la ricombinazione implica solamente l'unione di un segmento V a un segmento J, con formazione di un esone VJ. Tale esone rimane separato dalla regione C da un introne che permane nel trascritto primario dell'RNA. Lo splicing di quest'ultimo ha come risultato la rimozione dell'introne tra gli esoni VJ e C, generando un mRNA che produrrà o la catena κ o la catena λ. Nel locus λ, lo splicing alternativo dell'RNA può condurre all'utilizzo di ognuno dei quattro esoni di C_λ funzionali, non essendo nota alcuna differenza funzionale tra i prodotti delle diverse catene leggere λ. La produzione di una catena κ previene l'ulteriore riarrangiamento dei loci λ e, come già menzionato, tale riarrangiamento avviene solo se il precedente riarrangiamento λ è risultato non produttivo o se una catena κ riarrangiata risulta essere autoreattiva. Ne consegue che un singolo clone linfocitario B può esprimere solo uno dei due

tipi di catene leggere, fenomeno definito esclusione isotipica della catena leggera. Come nel locus della catena pesante, un gene κ o λ viene espresso solo da uno dei due cromosomi progenitori in qualsiasi linfocita B, mentre l'altro allele viene escluso. Inoltre, come per le catene pesanti, se entrambi gli alleli per le catene κ e λ sono vengono riarrangiati in modo non funzionale, tale cellula non riuscirà a sopravvivere in quanto incapace di ricevere i segnali di sopravvivenza generati dal BCR.

Le IgM neosintetizzate vengono espresse sulla superficie cellulare in associazione con le Igα e le Igβ, dove agiscono da recettori per gli antigeni. Nei linfociti B privi di elevata autoreattività, il BCR fornisce segnali indipendenti dal ligando che garantiscono la sopravvivenza cellulare e inducono l'interruzione dell'espressione dei geni *RAG*, prevenendo ulteriori riarrangiamenti genici. I linfociti B immaturi non proliferano, bensì si differenziano in risposta agli antigeni. Se nel midollo osseo i linfociti B riconoscono l'antigene con elevata affinità (come avviene per i linfociti B dotati di recettori multivalenti per autoantigeni midollari), essi possono andare incontro al processo di editing recettoriale o a morte cellulare (vedi più avanti). Questi processi sono importanti per la selezione negativa dei linfociti B fortemente autoreattivi. Viceversa, i linfociti B immaturi non fortemente autoreattivi lasciano il midollo osseo e completano la loro maturazione nella milza prima di migrare agli altri organi linfoidi secondari.

Sottopopolazioni dei linfociti B maturi

Le diverse sottopopolazioni dei linfociti B si sviluppano da specifici progenitori (Fig. 8-15). Le HSC del fegato fetale costituiscono i precursori dei linfociti B-1. Le HSC del midollo osseo danno invece origine alla maggior parte dei linfociti B. Questi ultimi passano velocemente attraverso due stadi di maturazione, venendo indirizzati verso i linfociti B della zona marginale (vedi più avanti) o i linfociti B follicolari. L'affinità del recettore per gli autoantigeni può contribuire all'orientamento del linfocita B verso l'una o l'altra delle due sottopopolazioni.

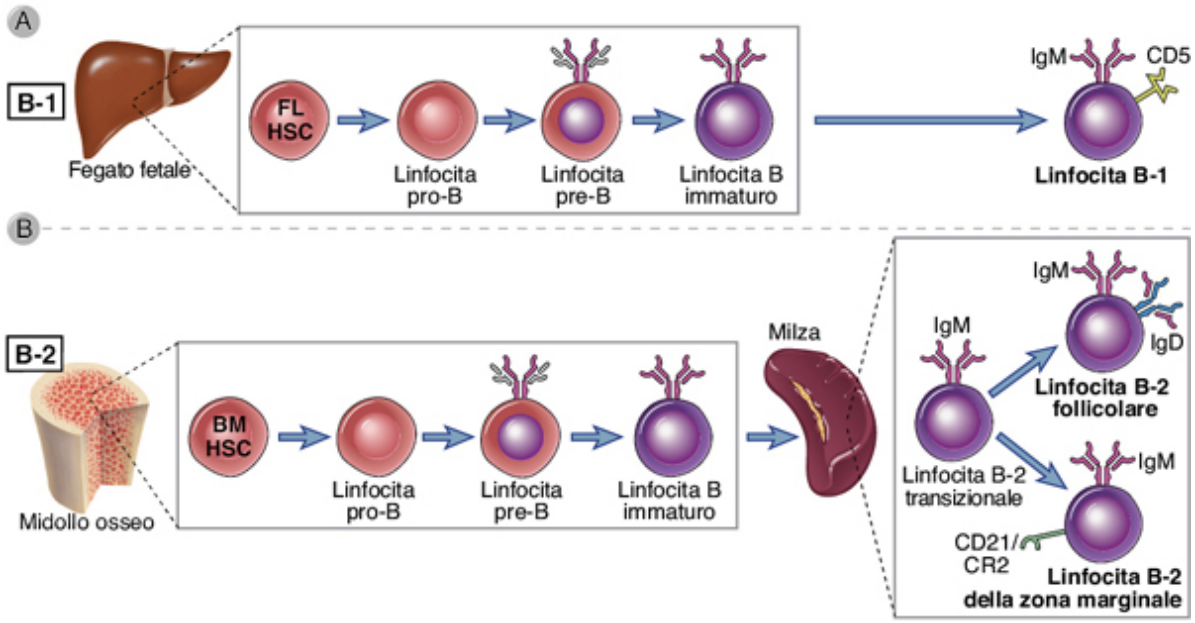


FIGURA 8-15 Sottopopolazioni di linfociti B. A. Molti linfociti B che si sviluppano dalle cellule staminali del fegato fetale si differenziano in linfociti B-1. **B.** I linfociti B generati dopo la nascita dai precursori del midollo osseo danno origine alla linea B-2. I linfociti B follicolari ricircolano, mentre i linfociti B della zona marginale sono particolarmente abbondanti nella milza dei roditori e nell'uomo possono essere ritrovati anche nei linfonodi.

Linfociti B follicolari

Molti linfociti B maturi appartengono alla sottopopolazione dei linfociti B follicolari, che esprimono le IgD, oltre alle IgM. Tali cellule esprimono catene pesanti sia μ sia δ partendo dallo stesso esone VDJ e generando quindi un dominio V identico. Le catene pesanti si associano poi alle stesse catene leggere κ o λ per assemblare due possibili recettori con la stessa specificità per l'antigene. L'espressione simultanea, in un linfocita B, dello stesso esone riarrangiato su due trascritti (uno che include gli esoni C_μ e l'altro gli esoni C_δ) avviene per splicing alternativo dell'RNA (Fig. 8-16). Inizialmente viene prodotto un lungo trascritto di RNA primario contenente il complesso VDJ riarrangiato e i geni C_μ e C_δ. Se il trascritto primario è tagliato e poliadenilato dopo l'esone μ, gli introni verranno eliminati cosicché il complesso VDJ vada a ricongiungersi con l'esone C_μ, portando alla formazione di un mRNA μ. Se invece il complesso VDJ non si ricongiunge all'esone C_μ bensì all'esone C_δ, si forma un mRNA δ. La successiva traduzione risulta nella sintesi di una catena μ o δ. La

poliadenilazione e lo splicing alternativo permettono quindi al linfocita B di produrre simultaneamente mRNA maturi e proteine di due diversi isotipi di catena pesante. Sono ancora poco noti i meccanismi che regolano la scelta tra poliadenilazione o splicing del sito accettore per cui il VDJ riarrangiato si unisce al C_μ o al C_δ, come pure i segnali che determinano quando e perché un linfocita B esprima sia le IgM sia le IgD piuttosto che le IgM da sole. La coespressione di IgM e IgD è accompagnata dall'acquisizione della competenza funzionale e della capacità di ricircolare e questa è la ragione per cui i linfociti B IgM^+IgD^+ sono definiti **linfociti B maturi**. La correlazione tra espressione delle IgD e acquisizione della competenza funzionale ha portato a supporre che le IgD siano essenziali per l'attivazione del recettore dei linfociti B maturi. Non vi è tuttavia alcuna evidenza di differenze funzionali tra le IgM e le IgD di membrana. Inoltre, la delezione del gene δ nel topo non ha un effetto significativo sulla maturazione o sulla risposta antigene-dipendente dei linfociti B. I linfociti B follicolari sono spesso definiti anche *linfociti B ricircolanti*, perché passano da un organo linfoide all'altro, colonizzando specifiche nicchie note come *follicoli* (vedi Cap. 2). I linfociti B sono mantenuti nei follicoli, almeno in parte, per azione di segnali di sopravvivenza sotto forma di una citochina della famiglia del fattore di necrosi tumorale detta BAFF (*fattore di attivazione della cellula B*) o BLyS (vedi Cap. 12).

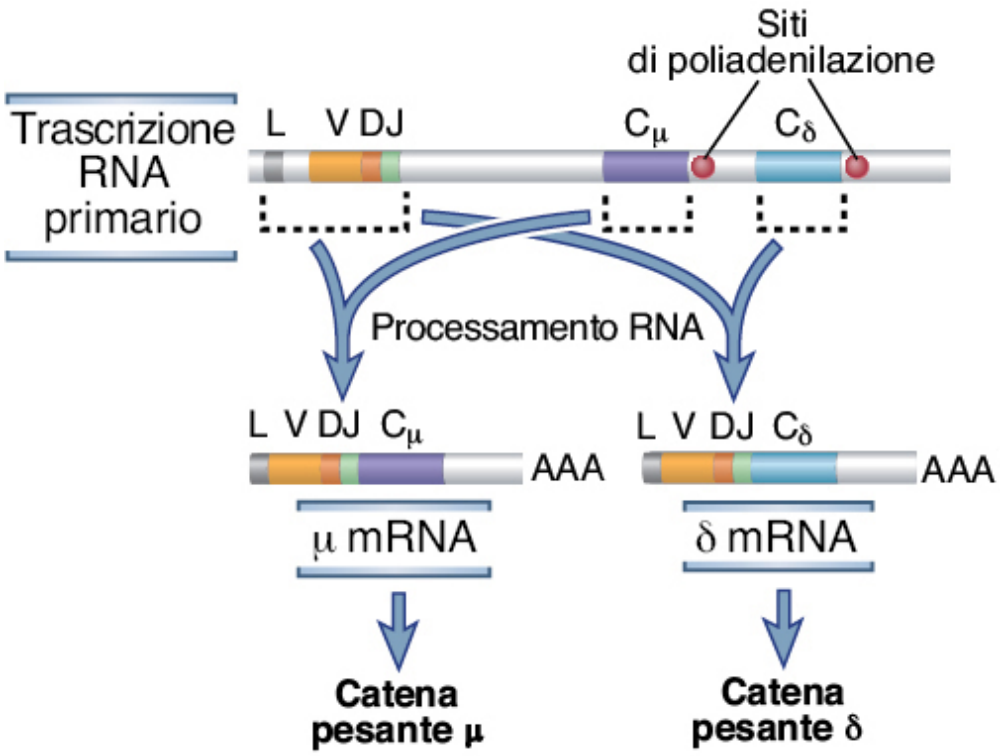


FIGURA 8-16 Coespressione di IgM e IgD. Lo "splicing" alternativo di un trascritto di RNA primario porta alla formazione di un mRNA μ o δ. Le linee tratteggiate indicano i segmenti di catena H che sono uniti in seguito allo splicing dell'RNA.

I linfociti B maturi naïve rispondono agli antigeni e, in assenza di tale incontro e della conseguente risposta, muoiono nel giro di pochi mesi. Nel Capitolo 12 vedremo come queste cellule rispondano all'antigene e come la loro espressione dei geni per le Ig cambi durante la differenziazione indotta dall'antigene.

Linfociti B-1 e della zona marginale

Una particolare sottopopolazione di linfociti B, detti linfociti B-1, esprime recettori per l'antigene dotati di una limitata diversità e svolge una serie di funzioni assai peculiari. Queste cellule originano dalle HSC del fegato fetale e sono state sinora caratterizzate meglio nei roditori. Nel topo, molte di queste cellule esprimono la molecola CD5. Negli adulti, un'importante popolazione di linfociti B-1 in continuo autorinnovamento si trova nel peritoneo e nelle mucose. Durante l'ontogenesi, i linfociti B-1 si sviluppano prima dei linfociti B follicolari e della zona marginale e, rispetto a questi, esprimono un repertorio di geni V limitato e con minore diversità

giunzionale (questo è anche la conseguenza della mancata espressione di TdT nel fegato fetale). I linfociti B-1 secernono spontaneamente anticorpi IgM frequentemente diretti contro polisaccaridi e lipidi di origine microbica o contro i lipidi ossidati derivati dal processso di perossidazione lipidica. Questi anticorpi sono spesso definiti anticorpi naturali perché sono presenti in assenza di un'evidente immunizzazione e sembra plausibile che la flora microbica dell'intestino rappresenti la fonte di antigeni che ne stimola la produzione. I linfociti B-1 garantiscono una rapida produzione di anticorpi contro i microrganismi, soprattutto in particolari sedi anatomiche come il peritoneo. A livello mucosale, circa la metà dei linfociti che secernono le IgA nella lamina propria derivano dai linfociti B-1. I linfociti B-1 sono analoghi ai linfociti T γδ, per il fatto che possiedono un repertorio di recettori per l'antigene limitato e si pensa che entrambe le sottopopolazioni rispondano a quegli antigeni microbici frequentemente riscontrabili negli epiteli, all'interfaccia con l'ambiente esterno.

Nell'uomo sono state descritte cellule simili ai linfociti B-1 anche se, nella nostra specie, CD5 non può essere considerato un marker identificativo per questa sottopopolazione, perché espresso anche dai linfociti in corso di maturazione e da alcune specifiche popolazioni linfocitarie attivate.

I linfociti B della zona marginale sono localizzati nella milza, prevalentemente nelle vicinanze del seno marginale, e assomigliano ai linfociti B-1 per la loro limitata diversificazione e per la loro capacità di rispondere agli antigeni polisaccaridici producendo anticorpi naturali. I linfociti B della zona marginale esistono sia nel topo sia nell'uomo ed esprimono le IgM e il corecettore CD21. Nel topo risiedono solo nella milza, mentre nell'uomo si possono trovare anche nei linfonodi. I linfociti B della zona marginale rispondono molto velocemente ai microbi presenti nel sangue e si differenziano in plasmacellule a vita breve che secernono IgM. Anche se generalmente mediano risposte T-indipendenti contro patogeni circolanti, sembra che queste cellule possano anche rispondere ad antigeni T-dipendenti.

Selezione del repertorio dei linfociti B maturi

Il repertorio dei linfociti B maturi è selezionato a partire dalle cellule immature. Come vedremo più avanti, il fenomeno della selezione positiva è

ben definito nei linfociti T ed è responsabile della selezione dei linfociti T $CD8^+$ e $CD4^+$ ristretti per molecole MHC di classe I e II, rispettivamente. Il riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti B non presuppone la restrizione per MHC e non è quindi possibile identificare un processo di selezione positivo analogo a quello dei linfociti T. In ogni caso, la selezione positiva risulta un fenomeno condiviso e necessario all'identificazione dei linfociti che hanno completato con successo il riarrangiamento del recettore per l'antigene. Solo i linfociti B che esprimono Ig di membrana funzionanti ricevono segnali costitutivi da parte del BCR che, come già descritto, sono necessari per la sopravvivenza dei linfociti B immaturi. Sembra che gli antigeni autoreattivi possano influi- re sull'intensità del segnale inviato dal BCR e quindi sul destino dei linfociti B periferici durante la loro maturazione.

I linfociti B immaturi che riconoscono antigeni autoreattivi con grande affinità possono essere indotti a modificare la loro specificità mediante un processo definito "**editing" (revisione) recettoriale**. Il riconoscimento di antigeni self da parte dei linfociti B immaturi induce la riattivazione dei geni *RAG* e il riarrangiamento e la produzione di una nuova catena leggera dell'Ig, consentendo alla cellula di esprimere un recettore diverso ("revisionato") non autoreattivo. Durante tale processo, l'esone VJκ originale codificante il dominio variabile della catena leggera autoreattiva viene generalmente deleto e sostituito mediante un nuovo riarrangiamento che interessa un segmento genico Vκ a monte e un segmento genico Jκ a valle. Se il processo di "editing" non riesce a generare un riarrangiamento della catena leggera κ produttiva "in-frame" su entrambi i cromosomi, il linfocita B immaturo attivato può poi riarrangiare il locus della catena leggeraλ localizzato su un altro cromosoma. Quasi tutti i linfociti B che possiedono catene leggere λ sono pertanto cellule che erano una volta autoreattive e che sono state sottoposte al processo di "editing" recettoriale.

Se l'editing recettoriale non ha successo, i linfociti B immaturi che esprimono recettori ad alta affinità per antigeni autoreattivi e che incontrano questi antigeni nel midollo osseo o nella milza possono morire per apoptosi, processo noto anche come **selezione negativa**. Gli antigeni che mediano tale processo, normalmente rappresentati da antigeni abbondanti o antigeni self polivalenti, come acidi nucleici, lipidi o proteine della membrana, inviano forti segnali ai linfociti B immaturi che esprimono IgM specifiche proprio

per questi autoantigeni. Sia l'editing recettoriale sia la selezione negativa sono responsabili del mantenimento della tolleranza dei linfociti B verso gli autoantigeni presenti nel midollo osseo (vedi Cap. 15).

Una volta avvenuta la transizione a linfocita B maturo IgM^+ IgD^+, il riconoscimento dell'antigene non induce più apoptosi né editing recettoriale, bensì proliferazione e differenziazione. Come risultato, i linfociti B maturi che riconoscono antigeni con alta affinità nei tessuti linfoidi secondari sono attivati e questo processo porta alla risposta immunitaria umorale. I linfociti B follicolari sono responsabili della maggior parte delle risposte anticorpali T-dipendenti ad antigeni di natura proteica (vedi Cap. 12).

SVILUPPO DEI LINFOCITI T

Lo sviluppo dei linfociti T maturi a partire da progenitori specifici avviene attraverso fasi successive che consistono nel riarrangiamento e nell'espressione dei geni per il TCR, nella proliferazione cellulare, nella selezione indotta dall'antigene e nell'acquisizione di capacità funzionali (Fig. 8-17). Da molti punti di vista questo processo è simile a quello dei linfociti B; tuttavia, la maturazione dei linfociti T ha caratteristiche uniche che riflettono la specificità della maggioranza di questi linfociti per antigeni peptidici associati a molecole MHC self e la necessità di un microambiente peculiare per la selezione di cellule dotate di tale specificità.

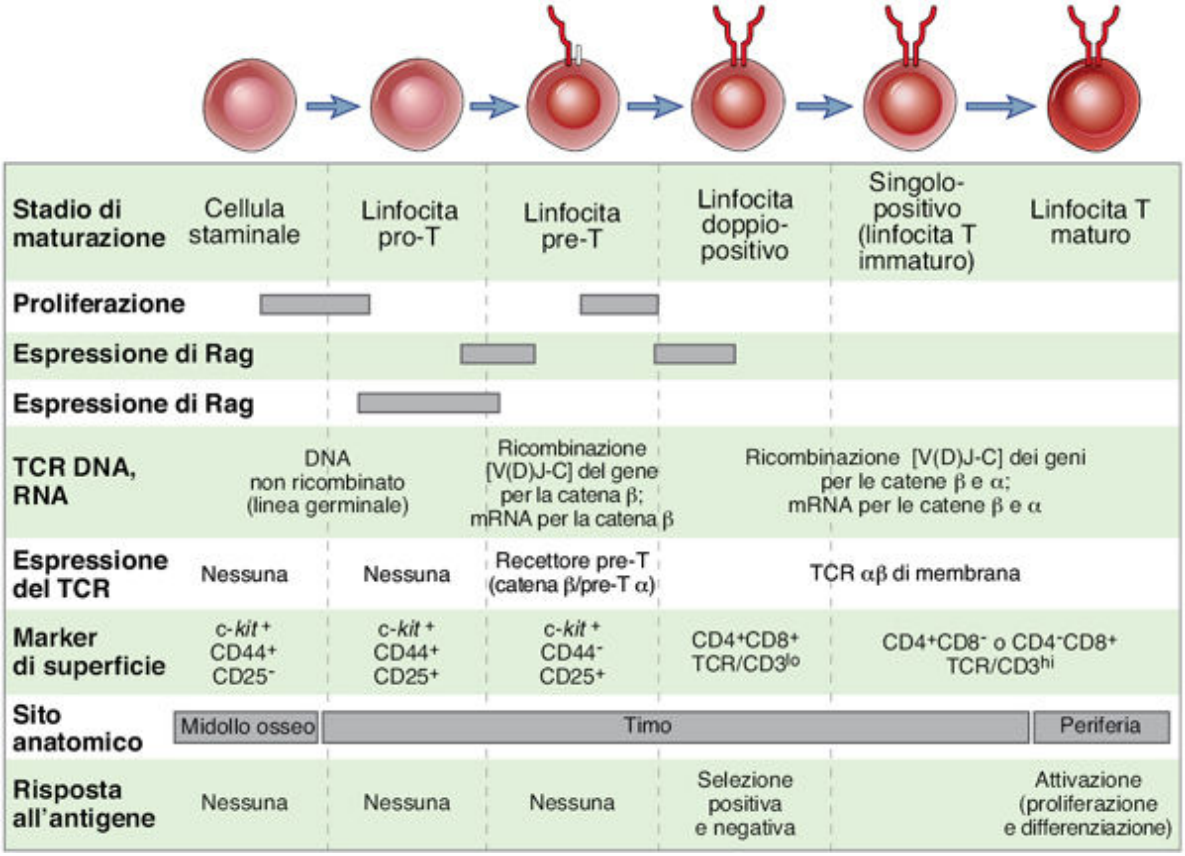


FIGURA 8-17 Stadi della maturazione dei linfociti T. Vengono illustrati gli eventi corrispondenti a ogni stadio della maturazione dei linfociti T, da una cellula staminale nel midollo osseo a un linfocita T maturo. Numerosi altri marcatori di superficie, oltre a quelli mostrati, sono stati utilizzati per identificare i diversi stadi di maturazione dei linfociti T.

Ruolo del timo nella maturazione dei linfociti T

Il timo è la principale sede di maturazione dei linfociti T. Tale funzione del timo fu inizialmente scoperta basandosi sul fatto che la mancanza di questo organo è associata a deficit immunologici. L'assenza congenita del timo (come avviene nella sindrome di DiGeorge nell'uomo o nel ceppo murino "nudo") si associa a un basso numero di linfociti T maturi in circolo e negli organi linfoidi secondari e a un grave deficit delle risposte T-dipendenti (vedi Cap. 20). Se il timo è rimosso nel topo neonato, questo non riesce a sviluppare linfociti T maturi. Il timo si sviluppa dall'endoderma, dalla terza tasca faringea e dalla sottostante cresta neuronale mesenchimale e viene solo in seguito popolato da precursori midollari. Va incontro a involuzione con l'età ed è quasi assente nell'uomo dopo la pubertà, una condizione questa associata a un calo dei linfociti T maturi. Un certo grado di maturazione dei

linfociti T continua tuttavia anche nell'adulto, come indicato dall'efficace ripristino del sistema immunitario in adulti che hanno subito il trapianto di midollo osseo. È possibile che il residuo di timo involuto sia sufficiente per una limitata maturazione dei linfociti T. D'altra parte, la lunga sopravvivenza dei linfociti T della memoria (anche 20 anni nell'uomo) e il loro conseguente accumulo riducono con l'età la necessità di generare nuovi linfociti T.

I linfociti T originano da precursori del fegato fetale e del midollo osseo adulto e successivamente popolano il timo. Questi precursori sono progenitori multipotenti che arrivano al timo provenendo dal circolo ematico attraversando l'endotelio di una venula postcapillare all'interfaccia corticomidollare. Nel topo, si iniziano a riscontrare nel timo i linfociti immaturi verso l'undicesimo giorno di gestazione (corrispondente circa all'ottava settimana di gestazione nell'uomo). Le cellule in corso di maturazione nel timo sono definite **timociti**. I timociti più immaturi non esprimono il TCR o i corecettori CD4 e CD8 e si trovano nel seno sottocapsulare e nella corticale esterna. Da qui, i timociti migrano attraverso la corticale, dove si verifica la maggior parte dei successivi eventi maturativi. È proprio nella corticale che i timociti esprimono per la prima volta il TCR γδ o αβ. I linfociti T αβ maturano a linfociti T $CD4^+$ ristretti per MHC II oppure $CD8^+$ ristretti per MHC I quando lasciano la zona corticale ed entrano nella midollare. Da questa, i timociti che hanno assunto la singola positività per $CD4^+$ o $CD8^+$ escono dal timo e si riversano nel torrente circolatorio. Nei paragrafi che seguono discuteremo il processo di maturazione dei linfociti T αβ; quello dei linfociti T γδ; sarà discusso successivamente.

L'ambiente timico fornisce gli stimoli necessari alla proliferazione e alla maturazione dei timociti. Molti di questi stimoli provengono da cellule diverse dai linfociti T in corso di maturazione. All'interno della corticale, le cellule timiche epiteliali formano un reticolo di lunghi prolungamenti citoplasmatici attraverso cui i timociti devono passare per raggiungere la midollare. Nella midollare è inoltre presente un tipo di cellule epiteliali ben distinto, note come cellule epiteliali timiche midollari, che svolgono un particolare ruolo nella presentazione di antigeni self per la selezione negativa dei linfociti T in corso di maturazione (vedi Cap. 15). Le cellule dendritiche midollari sono presenti alla giunzione corticomidollare e all'interno della

midollare, mentre i macrofagi si collocano soprattutto nella midollare. La migrazione dei timociti attraverso questa organizzazione anatomica permette le interazioni fisiche tra i timociti e le altre cellule necessarie alla maturazione e alla selezione dei linfociti T. Le cellule epiteliali e dendritiche timiche esprimono molecole MHC di classe I e classe II. Le interazioni dei timociti in corso di maturazione con le molecole MHC sono essenziali al fine della selezione del repertorio di linfociti T maturi, come verrà descritto più avanti.

Il movimento delle cellule all'interno e attraverso il timo è direzionato dalle chemochine. I progenitori dei timociti esprimono il CCR9, un recettore che lega la chemochina CCL25, prodotta a livello della corteccia timica. L'ingresso dei precursori cellulari nel timo dipende quindi da CCL25 e CCR9. Altre chemochine, come CCL21 e CCL19, riconosciute dal recettore CCR7 espresso dai timociti, regolano il passaggio dei timociti dalla corticale alla midollare. Infine, i linfociti T di nuova generazione, che esprimono il recettore della sfingosina 1-fosfato (vedi Cap. 3), escono dal midollo timico seguendo un gradiente di sfingosina 1-fosfato per entrare in circolo.

Le cellule timiche stromali, incluse le cellule epiteliali, secernono IL-7, già citata in precedenza come fattore di crescita linfopoietico fondamentale. Il ritmo di proliferazione e apoptosi dei timociti corticali è elevato. Un singolo precursore dà origine a un'ampia progenie, di cui il 95% muore per apoptosi prima di raggiungere la midollare. La morte cellulare è dovuta a una combinazione di fattori quali l'incapacità di riarrangiare correttamente il gene per la catena β del TCR (e quindi l'impossibilità di superare il "checkpoint" pre-TCR/β descritto più avanti) o di superare la selezione positiva, indotta dalle molecole MHC, o la selezione negativa causata dagli autoantigeni (vedi Fig. 8-3).

Stadi della maturazione T

La maturazione del linfocita T procede attraverso una serie di tappe sequenziali caratterizzate dal riarrangiamento dei geni per il TCR e dall'espressione del TCR insieme ai corecettori CD4 e CD8 (Fig. 8-18; vedi anche Fig. 8-17). Nel topo, il TCR γδ viene espresso nei 3-4 giorni successivi all'arrivo del precursore nel timo, mentre il TCR αβ nei 2-3 giorni successivi. Nel timo umano fetale, l'espressione del TCR γδ comincia circa

alla nona settimana di gestazione ed è seguita dall'espressione del TCR αβ alla decima settimana.

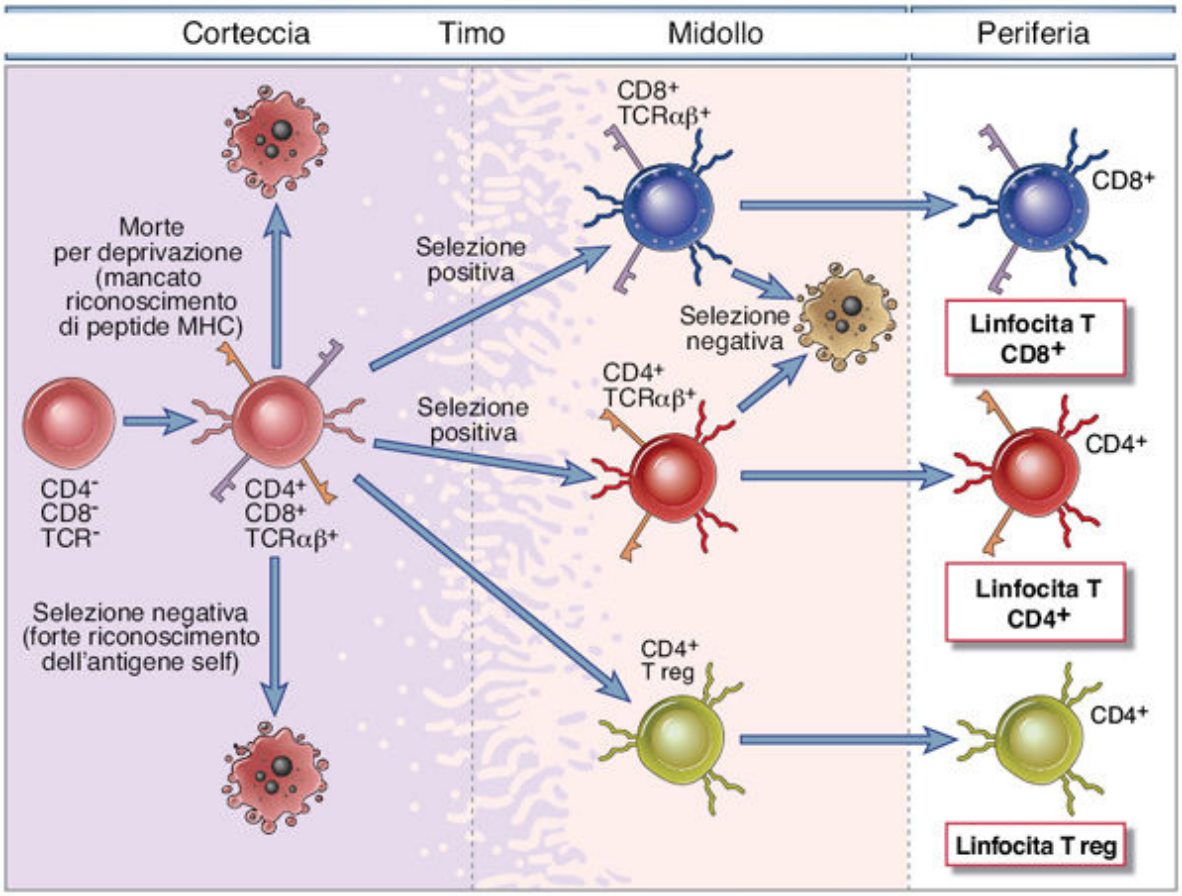


FIGURA 8-18 Maturazione dei linfociti T nel timo. I precursori dei linfociti T si spostano dal midollo osseo al timo attraverso il torrente circolatorio. Nella corticale del timo, i progenitori dei linfociti T αβ esprimono il TCR e i corecettori CD4 e CD8. I processi di selezione eliminano sia i linfociti T autoreattivi allo stadio di doppio-positivo (DP) nella corticale sia i timociti singolo-positivi (SP) nella midollare del timo. Gli stessi processi di selezione promuovono inoltre la sopravvivenza dei timociti dotati di TCR che legano molecole MHC con scarsa affinità. La differenziazione funzionale e fenotipica in linfociti T $CD4^+CD8^-$ o $CD8^+CD4^-$ avviene a livello della midollare e i linfociti T maturi vengono successivamente immessi in circolo. Alcune cellule doppio-positive si differenziano in linfociti T regolatori (vedi Cap. 15). Lo sviluppo di linfociti T γδ non è riportato in figura.

Timociti doppio-negativi

I timociti corticali più immaturi appena giunti dal midollo osseo contengono i geni per il TCR nella loro configurazione germinativa e non esprimono il TCR, CD3, la catena ζ, CD4 o CD8; queste cellule sono definite **timociti doppio-negativi**. A questo stadio maturativo i timociti sono considerati

linfociti pro-T. La maggioranza (>90%) dei timociti doppio-negativi che supera la selezione timica darà origine a linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$ ristretti per MHC, dotati di un TCR αβ la rimanente parte darà invece origine ai linfociti T γδ. Le proteine Rag-1 e Rag-2, espresse precocemente proprio durante lo sviluppo dei linfociti T doppio-negativi, sono necessarie per il riarrangiamento dei geni del TCR. Il riarrangiamento D_β-J_β al locus della catena β del TCR si verifica per primo e implica l'unione del segmento genico $D_\beta 1$ a uno dei 6 segmenti genici $J_\beta 1$ o l'unione del segmento $D_\beta 2$ a uno dei 6 segmenti genici $J_\beta 2$ (Fig. 8-19, *A*). I riarrangiamenti da V_β a DJ_β avvengono durante la transizione dei linfociti T αβ da pro-T a pre-T. Le sequenze di DNA tra gli elementi riarrangiati (D, J ed eventualmente i geni $C_\beta 1$ se sono usati i segmenti genici $D_\beta 2$ e $J_\beta 2$) sono eliminate durante questo processo. I trascritti nucleari primari dei geni per il TCR β contengono l'introne tra gli esoni VDJ_β ricombinati e il gene rilevante C_β (così come anche gli altri 3 introni localizzati tra i 4 esoni che costituiscono ciascun gene C_β, vedi nella figura illustrato un singolo esone per motivi di praticità). Code poli-A sono aggiunte dopo il taglio dei trascritti primari a valle dei siti di consenso di poliadenilazione localizzati in 3′ alla regione C_β, e le sequenze tra l'esone VDJ e C_β vengono tagliate per formare un mRNA maturo in cui i segmenti genici VDJ sono giustapposti al primo esone di uno qualsiasi dei geni C_β (a seconda di quale segmento J è stato selezionato durante il riarrangiamento). La traduzione di questo mRNA dà origine alla catena β del TCR completa. I due geni C_β sembrano essere funzionalmente intercambiabili e un singolo linfocita passi da un gene C a un altro. Inoltre, l'uso di uno dei due segmenti genici C_β non influenza la funzione o la specificità del TCR. I promotori della catena β localizzate nelle regioni adiacenti all'estremità 5' dei geni V_β funzionano insieme a un potente enhancer localizzato all'estremità 3' del gene $C_\beta 2$ una volta che i due geni sono ricongiunti dopo ricombinazione VDJ. La vicinanza del promotore all'enhancer è responsabile dell'elevata trascrizione del gene per la catena β del TCR riarrangiato.

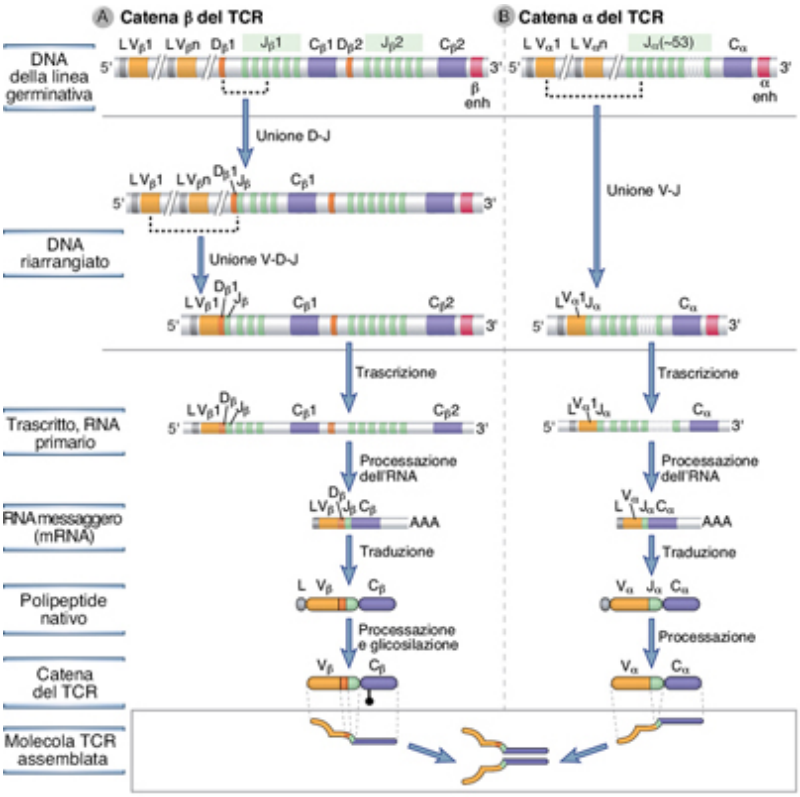


FIGURA 8-19 Ricombinazione ed espressione dei geni delle catene α e β del TCR. Viene mostrata la sequenza di eventi di ricombinazione ed espressione genica per la catena β (**A**) e per la catena α del TCR (**B**). In A, la regione variabile (V) della catena α del TCR riarrangiato include i segmenti genici $V_{\beta}1$ e $D_{\beta}1$ e il terzo segmento J nel raggruppamento $J_{\beta}1$. La regione costante (C) in questo esempio è codificata dagli esoni del gene $C_{\beta}1$, illustrato per praticità come singolo esone. Si noti che nel locus della catena β del TCR nell'uomo, il riarrangiamento inizia con l'unione D-J seguita dalla giunzione V-DJ. Sempre nell'uomo sono stati identificati 14 segmenti genici J_{β} (non tutti riportati nella figura). Nell'esempio mostrato in **B,** la regione V della catena α del TCR include il gene $V_{\alpha}1$ e il secondo segmento J nel raggruppamento J_{α} (nell'uomo questo raggruppamento è costituito da almeno 61 segmenti genici J_{α}, non tutti riportati nella figura).

Recettore pre-T

Se in un determinato linfocita T doppio negativo il riarrangiamento del gene per la catena β del TCR avviene correttamente, questa viene espressa sulla superficie della cellula in associazione a una proteina invariante (definita pre-Tα), a CD3 e alla catena ζ a formare il complesso del recettore pre-T (pre-TCR) (vedi Fig. 8-14, *B*). Il recettore pre-T guida la selezione dei linfociti in corso di maturazione che riarrangiano correttamente la catena β del TCR. Nel corso del riarrangiamento genico, dopo

l’aggiunta/rimozione delle basi, circa la metà di tutti i linfociti pre-T contiene un numero di nuove basi nel gene per la catena β del TCR che è un multiplo di tre (su almeno uno dei due cromosomi). Pertanto circa la metà di tutti i linfociti pre-T riesce a esprimere con successo una catena β del TCR. La funzione del complesso pre-TCR nello sviluppo del linfocita T è simile a quella del complesso pre-BCR, contenente la catena leggera sostitutiva, nello sviluppo del linfocita B. I segnali provenienti dal pre-TCR mediano la sopravvivenza di quei linfociti pre-T che hanno riarrangiato in modo corretto il gene della catena β del TCR e contribuiscono alla grandissima espansione proliferativa che avviene durante lo sviluppo T. I segnali provenienti dal TCR promuovono inoltre la ricombinazione del locus della catena α e guidano il passaggio dei timociti dallo stadio doppio-negativo a quello doppio-positivo (vedi più avanti). Questi segnali inibiscono ulteriori riarrangiamenti del locus della catena β, limitando la ricombinazione dell’altro allele. L’esclusione allelica della catena β fa sì che i linfociti T maturi esprimano solo uno dei due alleli della catena β ereditati. Come nei linfociti pre-B, non è noto se esista un ligando del pre-TCR. Si ritiene che i segnali del pre-TCR, come quelli del pre-BCR, siano generati indipendentemente dal ligando ma in seguito al corretto assemblaggio del complesso pre-TCR. La trasmissione del segnale da parte del pre-TCR interessa tirosine chinasi citosoliche e proteine adattatrici, che sono coinvolte anche nella trasduzione del segnale del TCR (vedi Cap. 7). La funzione essenziale del complesso pre-TCR è stata dimostrata da numerosi studi condotti in topi geneticamente modificati nei quali la mancanza di una qualsiasi delle componenti del complesso pre-TCR (per esempio la catena β, il pre-Ta, CD3, ç o Lck) causa un blocco maturativo nella fase di linfocita doppio-negativo.

Timociti doppio-positivi

Allo stadio successivo della maturazione, i timociti esprimono siaCD4siaCD8esonodefinititimocitidoppio-positivi. L’espressione di CD4 e CD8 è essenziale per la successiva maturazione (vedi più avanti). Il riarrangiamento dei geni della catena α del TCR e l’espressione degli eterodimeri ab si verifica nella popolazione $CD4^+CD8^+$ doppio-positiva subito prima che le cellule passino il punto di controllo pre-TCR (vedi Figg.

8-17 e 8-18). Un secondo picco di espressione tardiva del gene *RAG* allo stadio pre-T promuove la ricombinazione del gene α. Poiché non vi sono segmenti genici D nel locus a del TCR, il riarrangiamento consiste nella ricongiunzione dei soli segmenti genici V e J (vedi Fig. 8-19, *B*). L'elevato numero di segmenti genici J_α garantisce che possano avvenire tentativi multipli di unione V-J su ogni cromosoma, incrementando la probabilità che venga prodotto un TCR αβ funzionale. A differenza del locus per la catena β, dove la produzione della proteina e la formazione del pre-TCR sopprimono ulteriori riarrangiamenti, nel locus della catena α l'esclusione allelica è scarsa o del tutto assente. Quindi, riarrangiamenti produttivi del TCR α possono verificarsi su entrambi i cromosomi e, se questo avviene, il linfocita T esprimerà di conseguenza due catene α. In effetti, fino al 30% dei linfociti T periferici maturi esprime due distinti TCR, con la stessa catena β ma con catene α diverse. È comunque possibile che solo uno dei due diversi TCR partecipi alla selezione positiva diretta da MHC self (vedi più avanti). La regolazione trascrizionale del gene per la catena α avviene in modo simile a quella del gene per la catena β. All'estremità 5′ vi sono promotori di ciascun gene V_α dotati di una ridotta attività trascrizionale ma che si rendono responsabili di elevati livelli di trascrizione una volta resi contigui a un enhancer della catena α localizzato in 3′ al gene per la catena C_α. I riarrangiamenti del gene α del TCR non andati a buon fine su entrambi i cromosomi determineranno l'insuccesso della selezione positiva. I timociti della linea differenziativa T αβ che non hanno portato a termine riarrangiamenti produttivi della catena α del TCR moriranno per apoptosi.

L'espressione del TCR α allo stadio doppio-positivo porta alla formazione del TCR αβ completo, che è espresso sulla superficie cellulare in associazione con CD3 e la catena ζ. L'espressione coordinata di queste due proteine e l'assemblaggio del complesso TCR sono necessari per la loro espressione in superficie. Il riarrangiamento del gene per la catena α provoca la delezione del locus per la catena δ che si trova tra i segmenti genici V (comuni ai loci α e δ) e i segmenti genici J_α (vedi Fig. 8-6). Di conseguenza questo linfocita T viene irreversibilmente direzionato verso la differenziazione T αβ e non sarà più in grado di differenziarsi in linfocita T αβ. L'espressione dei geni *RAG* e l'ulteriore ricombinazione del gene TCR cessano dopo questo stadio maturativo.

I linfociti doppio-positivi che portano a termine con successo questi processi selettivi proseguono maturando in linfociti T CD4$^+$ o CD8$^+$, detti timociti singolo-positivi. Gli stadi della maturazione dei linfociti T nel timo possono pertanto essere facilmente distinti in base all'espressione di CD4 e CD8 (Fig. 8-20). A livello degli organi linfoidi secondari, questa maturazione fenotipica è accompagnata dal direzionamento irreversibile verso programmi funzionali distinti. In risposta a successive stimolazioni da parte dell'antigene, i linfociti CD4$^+$ acquisiscono la capacità di produrre citochine e di esprimere molecole effettrici (come il ligando di CD40) che attivano i linfociti B, le cellule dendritiche e i macrofagi, mentre i linfociti CD8$^+$ diventano capaci di produrre molecole ad attività citotossica. I timociti maturi singolo-positivi entrano nella midollare del timo per poi lasciare questo organo e andare a popolare i tessuti linfoidi secondari.

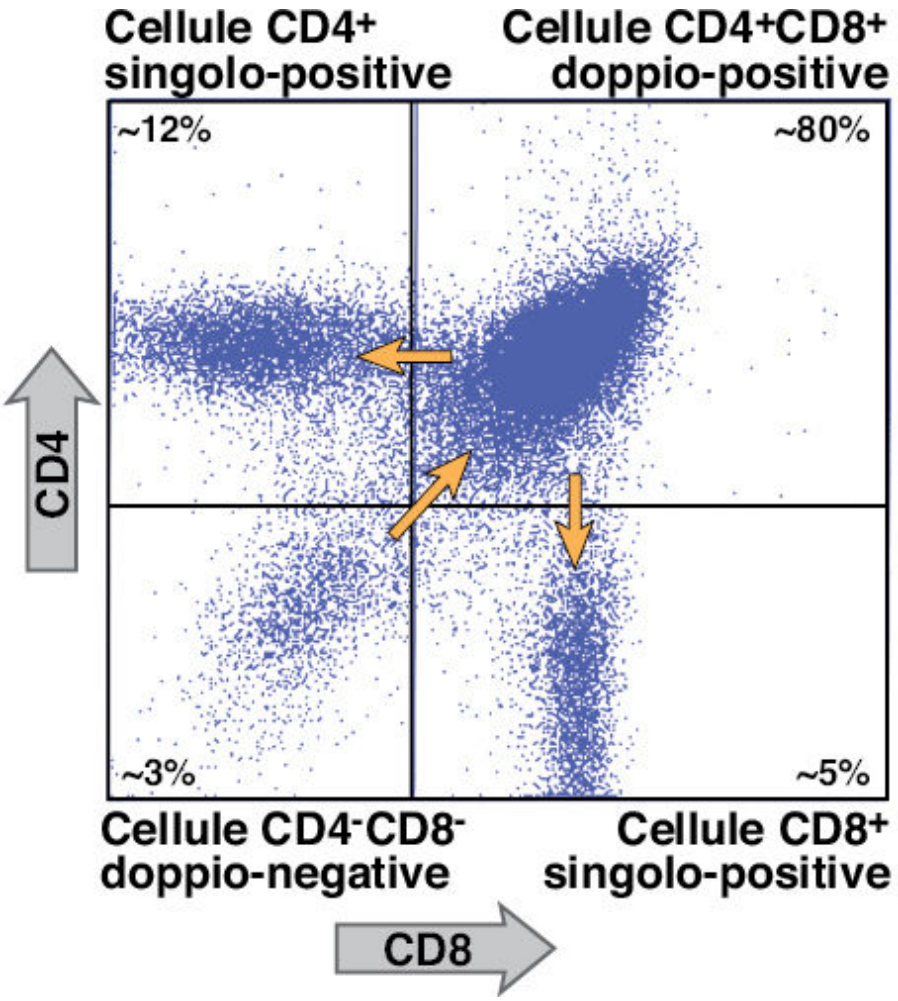


FIGURA 8-20 Espressione di CD4 e CD8 nei timociti e selezione positiva dei linfociti T nel timo. La maturazione dei timociti può essere seguita sulla base delle modificazioni nell'espressione dei corecettori CD4 e CD8. La figura mostra un'analisi di citometria a flusso a due colori, che utilizza anticorpi anti-CD4 e anti-CD8, ognuno marcato con un diverso fluorocromo. La percentuale delle quattro principali sottopopolazioni è indicata in corrispondenza del rispettivo quadrante. La popolazione di timociti più immatura è costituita dei linfociti $CD4^{-}CD8^{-}$ (doppio-negativi). Le *frecce* indicano la sequenza di maturazione.

Processi di selezione nella maturazione dei linfociti T αβ ristretti per MHC

La selezione dei linfociti T in corso di maturazione dipende dal riconoscimento degli antigeni (complessi peptide-MHC) nel timo ed è responsabile della conservazione delle cellule utili e dell'eliminazione di quelle potenzialmente dannose. Il repertorio immaturo (o non selezionato) dei linfociti T consiste in cellule dotate di recettori che possono riconoscere qualsiasi antigene proteico (self o estraneo) presentato da molecole MHC (anch'esse self o estranee). Inoltre, possono essere espressi recettori che teoricamente potrebbero non riconoscere alcun complesso peptide-MHC. In ogni individuo, i soli linfociti T utili sono quelli specifici per peptidi non-self presentati dalle molecole MHC dell'individuo stesso (MHC self). Quando i timociti doppio-positivi iniziano a esprimere TCR αβ, questi recettori incontrano peptidi self (i soli peptidi di norma presenti nel timo) presentati da molecole MHC self (le sole molecole MHC disponibili) espresse prevalentemente dalle cellule timiche epiteliali della corteccia. Il risultato di questo riconoscimento dipende principalmente dall'affinità del legame tra TCR e complessi MHC-antigene self. La **selezione positiva** è il processo attraverso cui vengono selezionati i linfociti T dotati di TCR che si legano con bassa affinità ai complessi MHC-peptide self, preservando così quelle cellule che potranno riconoscere gli antigeni esogeni presentati dalle molecole MHC di quel dato individuo. Simultaneamente, le cellule vengono indirizzate verso la linea CD4 o CD8 in base alla capacità del TCR di riconoscere molecole MHC rispettivamente di classe II o I. È infine importante notare come in ogni individuo, i linfociti T che riconoscono autoantigeni con elevata affinità siano potenzialmente dannosi poiché tale riconoscimento potrebbe dare luogo a malattie autoimmuni. La **selezione negativa** è il processo attraverso il quale i timociti dotati di TCR che legano fortemente agli autoantigeni, in associazione a molecole MHC self, vengono

eliminati (vedi Fig. 8-18). Le conseguenze di questi processi di selezione sono che il repertorio di linfociti T maturi che lasciano il timo è ristretto per MHC self e tollerante a molti autoantigeni e che solo i linfociti utili portano a termine il processo di maturazione. Nei paragrafi seguenti tratteremo in dettaglio i processi di selezione positiva e negativa.

Selezione positiva dei timociti: sviluppo del repertorio dei linfociti T ristretti per MHC

La selezione positiva è quel processo attraverso il quale i timociti dotati di TCR che legano con bassa affinità i complessi MHC-peptidi self vengono stimolati a sopravvivere (vedi Fig. 8-18). I timociti doppio-positivi sono prodotti in assenza di stimolazione da parte dell'antigene e iniziano a esprimere TCR αβ dotati di specificità casuali predisposti a riconoscere strutture simili alle molecole MHC. Nella corticale timica, questi timociti incontrano cellule epiteliali che presentano una varietà di peptidi self legati a molecole MHC di classe I e II. Un riconoscimento a bassa affinità di questi complessi promuove la sopravvivenza del timocita. Invece, i timociti dotati di recettori che non riconoscono molecole MHC self vengono indotti a morte per apoptosi con un meccanismo definito morte per deprivazione (*death by neglect*) (vedi Fig. 8-18). In conclusione, la selezione positiva garantisce che i linfociti T siano ristretti per MHC self.

Durante la transizione da cellula doppio-positiva a cellula singolo-positiva, i timociti dotati di TCR ristretti per MHC di classe I divengono $CD8^+CD4^-$, mentre quelli dotati di TCR ristretti per MHC di classe II divengono $CD4^+CD8^-$. I timociti doppio-positivi esprimono TCR che possono riconoscere MHC self di classe I o di classe II. Sono state formulate due teorie per spiegare il processo che porta al corretto accoppiamento dei corecettori con i TCR che riconoscono l'appropriata molecola MHC. Il modello stocastico o probabilistico postula che la differenziazione di un linfocita T doppio-positivo verso un linfocita $CD4^+$ o $CD8^+$ sia del tutto casuale. In tale modello, una cellula che riconosca molecole MHC di classe I self può casualmente differenziare in un linfocita $CD8^+$ che, esprimendo gli appropriati corecettori, potrà sopravvivere oppure si può differenziare in un $CD4^+$ (quindi un linfocita dotato di corecettori sbagliati) che, non riuscendo a ricevere i segnali di sopravvivenza, sarà indotto a morte. In questo

modello, il corecettore dovrebbe non essere appropriato all'MHC espresso dalla stessa cellula circa nella metà dei casi.

Nel secondo e generalmente più accettato modello, si presuppone che l'orientamento verso una delle due sottopopolazioni linfocitarie non sia casuale ma il risultato di un processo orientato da segnali specifici che indirizzano i linfociti T a differenziare in $CD4^+$ o $CD8^+$. La teoria "educativa" suggerisce che i TCR, ristretti per MHC di classe I o II, forniscano segnali che inducono attivamente l'espressione del corecettore appropriato, interrompendo al contempo l'espressione dell'altro corecettore. È stato effettivamente dimostrato che un linfocita doppio-positivo attraversa uno stadio in cui esprime elevati livelli di CD4 e bassi livelli di CD8. Se il TCR di tale cellula è ristretto per MHC di classe I, nel momento in cui dovesse riconoscere lo specifico peptide self riceverebbe un debole segnale a causa dei bassi livelli di CD8 e, inoltre, CD8 si associerebbe meno efficientemente alla tirosino-chinasi Lck di quanto non sia in grado di fare CD4. Questi deboli segnali attivano fattori di trascrizione quali Runx3 che mantengono il fenotipo $CD8^+$ T regolando l'espressione di CD8 stesso e di fattori di trascrizione a valle e spingono l'ulteriore differenziazione dei linfociti T $CD8^+$ in linfociti T citotossici al termine del processo di maturazione e dopo la loro attivazione da parte dell'antigene. Viceversa, se il TCR del linfocita è ristretto per MHC di classe II, in seguito al riconoscimento di un peptide presentato su classe II, la cellula riceverebbe un segnale forte, grazie agli elevati livelli di espressione di CD4 e al fatto che CD4 si associa con maggiore efficienza a Lck. Questi segnali forti attivano il fattore di trascrizione GATA3 che spinge la differenziazione dei linfociti T verso la linea CD4 e induce l'espressione di un repressore detto ThPoK, che previene l'espressione di geni differenziativi dei linfociti T $CD8^+$.

I peptidi associati a molecole MHC sulle cellule epiteliali timiche svolgono un ruolo essenziale nella selezione positiva. Nel Capitolo 6 abbiamo descritto come le molecole MHC di classe I e II siano sempre associate a un peptide. I peptidi presentati dalle cellule timiche svolgono probabilmente un duplice ruolo nella selezione positiva: stabilizzano l'espressione delle molecole MHC sulla superficie cellulare e influenzano le specificità dei linfociti T selezionati. Infatti, numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato come alcuni peptidi siano più efficienti di altri nel favorire

la selezione positiva e possano differire nel repertorio dei linfociti T che selezionano. Tali osservazioni suggeriscono che anche il riconoscimento dell'antigene, e non solo il riconoscimento dell'MHC, svolga un ruolo nel processo di selezione positiva. Una conseguenza del fatto che la selezione positiva avviene sulla base del riconoscimento di peptidi self è che anche i linfociti T maturi hanno la capacità di riconoscere peptidi self. Abbiamo visto nel Capitolo 2 che la sopravvivenza dei linfociti naïve, prima dell'incontro con l'antigene estraneo, richiede segnali che sono apparentemente generati dal riconoscimento di antigeni self negli organi linfoidi secondari. Gli stessi peptidi self che mediano la selezione positiva dei timociti doppio-positivi potrebbero svolgere un ruolo nella sopravvivenza dei linfociti T naïve (singolo-positivi) negli organi linfoidi secondari, come i linfonodi e la milza.

Il modello di selezione positiva basato sul debole riconoscimento di antigeni self pone una questione fondamentale: in che modo la selezione positiva guidata da un debole riconoscimento degli autoantigeni può indurre la produzione un repertorio di linfociti T maturi specifici per antigeni non-self? La probabile risposta è che la selezione positiva permette a diversi cloni T che riconoscono peptidi self con scarsa affinità di sopravvivere e differenziarsi. Molti di questi linfociti T, una volta raggiunta la maturazione, casualmente riconosceranno anche peptidi estranei con un'affinità sufficientemente elevata da permettere loro di generare risposte immuni competenti.

Selezione negativa dei timociti: tolleranza centrale

I timociti dotati di recettori che riconoscono a livello timico con elevata affinità il complesso peptide-MHC vanno incontro ad apoptosi (selezione negativa) o si differenziano in linfociti T regolatori (vedi Fig. 8-18). Alcuni dei linfociti T doppio-positivi generati nel timo possono esprimere un TCR che riconosce antigeni self con elevata affinità. I peptidi presenti nel timo sono peptidi self derivati da proteine ampiamente espresse nell'organismo e da alcune proteine la cui espressione è normalmente ristretta a particolari tessuti. Ricordiamo che i microrganismi che penetrano attraverso le principali vie (per esempio gli epiteli) sono captati e trasportati ai linfonodi e sono quindi esclusi dal timo. Nei linfociti T immaturi, la principale

conseguenza del riconoscimento di un antigene a elevata affinità causa apoptosi. Pertanto, i timociti che esprimono recettori dotati di elevata affinità per gli antigeni self timici muoiono, determinando la selezione negativa del repertorio dei linfociti T. Questo processo elimina i linfociti T autoreattivi, potenzialmente dannosi, e costituisce uno dei meccanismi che assicurano che il sistema immunitario non risponda agli antigeni self; questa proprietà viene definita tolleranza al self. La tolleranza indotta dal riconoscimento di antigeni self negli organi linfoidi primari (o centrali) da parte di linfociti immaturi è anche definita *tolleranza centrale*, per distinguerla dalla tolleranza periferica esercitata dai linfociti maturi nei tessuti periferici. Tratteremo in maggiore dettaglio i meccanismi e l'importanza fisiologica della tolleranza immunitaria nel Capitolo 15.

L'eliminazione dei linfociti T autoreattivi immaturi può avvenire sia allo stadio di cellule doppio-positive, nella corticale timica, sia nei linfociti T singolo-positivi neoformati nella midollare. Le cellule timiche che presentano l'antigene e determinano la selezione negativa sono prevalentemente cellule dendritiche e macrofagi che originano dal midollo osseo (entrambi particolarmente abbondanti nella zona midollare timica) e cellule epiteliali midollari. Diversamente, le cellule epiteliali corticali sono specifiche (e forse anche esclusive) per la selezione positiva. I linfociti T doppio-positivi sono attirati verso il midollo timico dalle chemochine. Qui, le cellule timiche epiteliali esprimono una proteina nucleare detta **AIRE (*AutoImmune REgulator*),** che determina a livello timico l'espressione di numerosi geni tessuto-specifici. Tali geni sono normalmente espressi solo negli organi periferici. La loro espressione timica determinata da AIRE fa in modo che molti peptidi tessuto-specifici divengano disponibili per la loro presentazione ai linfociti T in corso di maturazione, agevolando il processo di selezione negativa. A sottolineare l'importanza di AIRE nella tolleranza centrale ad antigeni tessuto-specifici, mutazioni nel gene che codifica per AIRE comportano una sindrome autoimmune poliendocrina (vedi Cap. 15).

Il meccanismo chiave che regola la selezione negativa nel timo è l'induzione della morte per apoptosi. A differenza del fenomeno della morte per deprivazione, che avviene per assenza di segnali di sopravvivenza dovuta alla mancata selezione positiva, nella selezione negativa, il riconoscimento a elevata affinità dell'antigene da parte del TCR genera segnali che promuovono in modo attivo la morte apoptotica dei timociti.

L’induzione dell’espressione di una proteina proapoptotica definita Bim, indotta dall’attivazione del TCR, svolge probabilmente un ruolo importante nell’indurre l’alterazione della permeabilità della membrana mitocondriale e quindi dell’apoptosi dei timociti durante il processo di selezione negativa (vedi Cap. 15). È quindi ormai assodato che il riconoscimento ad alta affinità dell’antigene da parte di linfociti T immaturi scateni l’apoptosi, mentre lo stesso riconoscimento da parte dei linfociti T maturi (in concerto con altri segnali) induca la risposta immunitaria (vedi Cap. 9). Le basi biochimiche di questa fondamentale differenza non sono state ancora chiarite.

Il riconoscimento degli antigeni self nel timo può anche portare alla generazione di una sottopopolazione di linfociti T regolatori CD4$^+$ che agiscono prevenendo le reazioni autoimmuni (vedi Cap. 14). Non sono ancora noti i fattori che determinano la scelta tra i due destini alternativi dei linfociti T immaturi che riconoscono gli autoantigeni con alta affinità, ovvero l’eliminazione o la differenziazione in linfociti T regolatori. È possibile che interazioni forti portino all’eliminazione, mentre interazioni più deboli determinino invece lo sviluppo dei linfociti T regolatori; non esistono tuttavia evidenze chiare a riguardo.

Linfociti T γδ

I timociti che esprimono i TCR αβ e γδ appartengono a linee differenziative separate ma che originano da un precursore comune. Nel timo fetale, i primi riarrangiamenti dei geni per il TCR coinvolgono i loci γ e δ. La loro ricombinazione procede in modo simile a quella degli altri recettori per l’antigene, benché con un ordine di riarrangiamento meno rigido. In un linfocita T doppio-negativo, è possibile che avvenga il riarrangiamento dei loci per le catene β, γ o δ del TCR. Se il riarrangiamento in modo produttivo dei loci γ e δ avviene prima che questa porti a termine il riarrangiamento della catena β, essa viene selezionata per diventare un linfocita T γδ. Questo avviene in circa il 10% dei linfociti T doppio negativi, mentre in circa il 90% delle volte viene effettuato prima il riarrangiamento produttivo di una catena β. In questo caso, i segnali generati dal pre-TCR selezionano quelle cellule che differenzieranno in linfociti T αβ. Inoltre, la delezione della catena δ che avviene in seguito al riarrangiamento della

catena porterà all'indirizzamento irreversibile verso i linfociti T αβ (ricordiamo che il locus δ è inserito nel locus α).

Il grado di diversificazione del repertorio di linfociti T γδ è teoricamente anche superiore a quello del repertorio T αβ, in parte perché le sequenze di riconoscimento eptameronomero adiacenti ai segmenti genici D consentono l'unione D-D. Paradossalmente, tuttavia, la diversificazione dei TCR γδ è limitata perché, per motivi ancora sconosciuti, solo pochi segmenti genici V, D e J sono usati nei linfociti T γδ maturi. Questa limitata diversificazione ricorda quella della sottopopolazione B-1 dei linfociti B e ben si accorda con il concetto che i linfociti T γδ fungano da difesa precoce contro un numero limitato di microrganismi comunemente incontrati a livello delle barriere epiteliali. Le funzioni dei linfociti T γδ verranno descritte in modo più approfondito nel Capitolo 10. In questo stesso capitolo verrà anche descritta un'altra popolazione minore di linfociti che si sviluppa nel timo e che viene definita NKT.

RIEPILOGO

* I linfociti B e T originano da precursori comuni midollari, che vengono indirizzati verso la differenziazione linfocitaria. La maturazione dei linfociti B avviene nel midollo osseo, mentre i progenitori dei linfociti T migrano al timo, dove completano la maturazione. Le fasi iniziali del processo maturativo sono caratterizzate dalla proliferazione indotta da citochine, principalmente l'IL-7, che porta a una marcata espansione del numero dei linfociti che hanno iniziato la loro differenziazione.
* Segnali extracellulari inducono l'attivazione di fattori di trascrizione che a loro volta inducono l'espressione di geni specifici per le diverse linee differenziative e rendono accessibili a livello cromatinico specifici loci genici codificanti per il recettore per l'antigene.
* La maturazione dei linfociti B e T comporta il riarrangiamento somatico dei segmenti genici del recettore per l'antigene e l'espressione iniziale di proteine della catena μ delle Ig, nei precursori dei linfociti B, e della catena β del TCR nei precursori dei linfociti T. La precoce espressione dei prerecettori per l'antigene e la successiva espressione dei recettori maturi sono essenziali per la sopravvivenza, l'espansione e la maturazione dei linfociti e per i processi di selezione che portano a un repertorio di specificità antigeniche utili e diversificate.
* I recettori per l'antigene dei linfociti B e T sono codificati da corrispondenti geni formati da un numero limitato di segmenti genici che sono spazialmente segregati in configurazione germinativa, ma che subiscono la ricombinazione somatica nei linfociti B e T in corso di maturazione.
* Loci separati codificano per le catene pesanti e per le catene leggere κ e λ delle Ig e per le catene β, α, δ e γ del TCR. Questi loci contengono i segmenti genici V, J e, solamente nei loci della catena pesante delle Ig e delle catene β e δ del TCR, anche i segmenti genici D. I

segmenti genici J sono adiacenti all'estremità 5' degli esoni che codificano i domini costanti, mentre i segmenti genici V si localizzano a grande distanza a monte dei segmenti genici J. Quando presenti, i segmenti genici D si localizzano tra i cluster V e J. Il riarrangiamento somatico di entrambi i loci per le Ig e il TCR comporta l'unione dei segmenti genici D e J nei loci che contengono i segmenti genici D, seguita dall'unione del segmento V ai segmenti genici DJ ricombinati o, alternativamente, l'unione diretta V-J negli altri loci.

* Questi processi di ricombinazione somatica sono mediati da un complesso enzimatico di ricombinasi costituito da Rag-1 e Rag-2, due enzimi espressi in modo specifico dai linfociti.
* La diversificazione del repertorio anticorpale e del TCR è generata dalle associazioni combinatorie dei segmenti genici V, D e J presenti in linea germinativa e dalle differenze giunzionali generate dall'aggiunta o dalla rimozione casuale di nucleotidi nei punti di ricombinazione. Questi meccanismi sono responsabili della diversificazione presente alla giunzione dei segmenti genici che formano le terze regioni ipervariabili sia degli anticorpi sia delle catene del TCR.
* La maturazione dei linfociti B avviene attraverso stadi caratterizzati da diversi profili di riarrangiamento ed espressione dei geni Ig. Nei precursori B più immaturi, detti linfociti pro-B, i geni Ig sono ancora nella loro configurazione germinativa e il riarrangimento D-J avviene nel locus della catena pesante.
* Allo stadio di transizione da pro-B a pre-B, la ricombinazione V-D-J nel locus della catena H delle Ig è completa. Il primo trascritto di RNA prodotto contiene l'esone VDJ e gli esoni del gene C delle Ig. A questo punto l'esone VDJ viene ricongiunto agli esoni della regione C_μ della catena pesante, così da generare un mRNA maturo che viene poi tradotto nella catena μ in quei linfociti nei quali si è verificato un riarrangiamento "in-frame". Viene formato un pre-BCR mediante l'accoppiamento della catena μ con una catena leggera invariabile e l'associazione con le catene Igα e Igβ. Tale recettore genera segnali di sopravvivenza, di proliferazione e di inibizione per il riarrangiamento della catena pesante presente sull'altro allele (esclusione allelica).
* Nel corso della transizione a linfocita B immaturo, la ricombinazione V-J avviene inizialmente nel locus κ e vengono quindi espresse le catene leggere successivamente assemblate alle catene pesanti a formare le IgM che saranno espresse sulla superficie cellulare. I linfociti B immaturi lasciano il midollo osseo per popolare gli organi linfoidi secondari, dove completano la loro maturazione. Allo stadio di linfocita B maturo, la sintesi delle catene pesanti μ e δ avviene contemporaneamente grazie allo splicing alternativo dei trascritti per le catene pesanti che porta all'espressione di IgM e IgD di membrana.
* Durante la loro maturazione, i linfociti B immaturi che esprimono recettori ad alta affinità per gli antigeni self presenti nel midollo osseo possono ulteriormente riarrangiare i geni del proprio recettore per evitare di essere eliminati. Il fenomeno dell'editing recettoriale prevede ulteriori riarrangiamenti prima nel locus per la catena κ e quindi anche in quello per la catena λ. I linfociti B che esprimono le catene κ sono infatti cellule che hanno verosimilmente subito il processo di editing recettoriale.
* Anche la maturazione dei linfociti T nel timo progredisce per stadi caratterizzati da diversi profili di espressione dei geni per il recettore per l'antigene, dall'espressione dei corecettori CD4 e CD8 e dalla sede all'interno del timo dove avvengono gli eventi di sviluppo. Le prime cellule della linea T che migrano nel timo non esprimono TCR, CD4 o CD8. I linfociti T in corso di maturazione, detti timociti, popolano inizialmente la corticale

esterna, dove vanno incontro a proliferazione, riarrangiamento dei geni per il TCR ed espressione in membrana di CD3, TCR, CD4 e CD8. Quando le cellule maturano, migrano dalla corticale alla midollare.

* I timociti meno maturi, detti linfociti pro-T, sono $CD4^{-}CD8^{-}$ (doppio-negativi). In queste cellule i geni per il TCR sono ancora nella configurazione germinativa e vanno incontro al riarrangiamento delle catene β, δ e γ.
* Allo stadio di pre-T, i timociti continuano a essere doppio-negativi, ma la ricombinazione V-D-J è completa al locus della catena β. Vengono quindi espressi trascritti primari della catena β che sono processati in modo da portare l'esone VDJ adiacente a un segmento C_{β} e permettere quindi la produzione della catena β del TCR. In quei linfociti ove sia avvenuto un riarrangiamento produttivo, la catena β del TCR si associa con la proteina invariante pre-Tα per formare un pre-TCR. Il pre-TCR trasduce i segnali che inibiscono il riarrangiamento della catena β sull'altro allele (esclusione allelica) e promuovono la differenziazione dei timociti allo stadio di doppia espressione di CD4 e CD8 (doppio-positivo), oltre alla loro ulteriore proliferazione. In questo stadio si verifica la ricombinazione V-J nel locus per la catena α del TCR che porta alla trascrizione della corrispondente proteina e all'espressione in membrana di bassi livelli di TCR.
* I processi di selezione guidano la maturazione dei timociti doppio-positivi, TCR^{+} e determinano la loro restrizione per l'MHC self e la tolleranza al self.
* La selezione positiva dei timociti $CD4^{+}CD8^{+}$, TCR αβ avviene in seguito al riconoscimento a bassa affinità dei complessi peptide-MHC espressi dalle cellule epiteliali timiche determinandone la sopravvivenza. Nel corso della loro maturazione, i linfociti TCR αβ si spostano nella midollare e diventano $CD4^{+}CD8^{-}$ o $CD8^{+}CD4^{-}$. L'indirizzamento verso una delle due linee differenziative si accompagna al fenomeno della selezione positiva, caratterizzato dall'accoppiamento di un TCR, che riconosce MHC I, con l'espressione di CD8 e l'inibizione dell'espressione di CD4. I TCR che invece riconoscono MHC II sono accoppiati all'espressione di CD4 e all'inibizione di quella di CD8.
* La selezione negativa dei timociti $CD4^{+}CD8^{+}$ TCR αβ avviene in seguito al riconoscimento con elevata affinità di antigeni che sono presenti ad alte concentrazioni nel timo. Questo processo è responsabile della tolleranza a molti antigeni self. I timociti midollari che non vengono selezionati negativamente acquisiscono la capacità di differenziarsi in linfociti T vergini $CD4^{+}$ o $CD8^{+}$ che migrano negli organi linfoidi secondari.

LETTURE CONSIGLIATE

Fasi precoci della maturazione dei linfociti B e ricombinazione V(D)J

Clark M.R.; Mandal M.; Ochiai K.; Singh H: Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signaling. *Nature Reviews Immunology* 14 69–80 (2014).

Cobaleda C.; Busslinger M: Developmental plasticity of lymphocytes. *Current Opinion in Immunology* 20 139–148 (2008).
Jenkinson E.J.; Jenkinson W.E.; Rossi S.W.; Anderson G.. The thymus and T-cell commitment: the right choice for Notch? *Nature Reviews Immunology* 6 551–555 (2006).
Johnson K.; Reddy K.L.; Singh H: Molecular pathways and mechanisms regulating the recombination of immunoglobulin genes during B-lymphocyte development. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 650 133–147 (2009).
Jung D.; Giallourakis C.; Mostoslavsky R.; Alt F.W: Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annual Review of Immunology* 24 541–570 (2006).
Nemazee D: Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nature Reviews Immunology* 6 728–740 (2006).
Schatz D.G.; Ji Y.. Recombination centers and the orchestration of V(D)J recombination. *Nature Reviews Immunology* 11 251–263 (2011).

Maturazione dei linfociti T

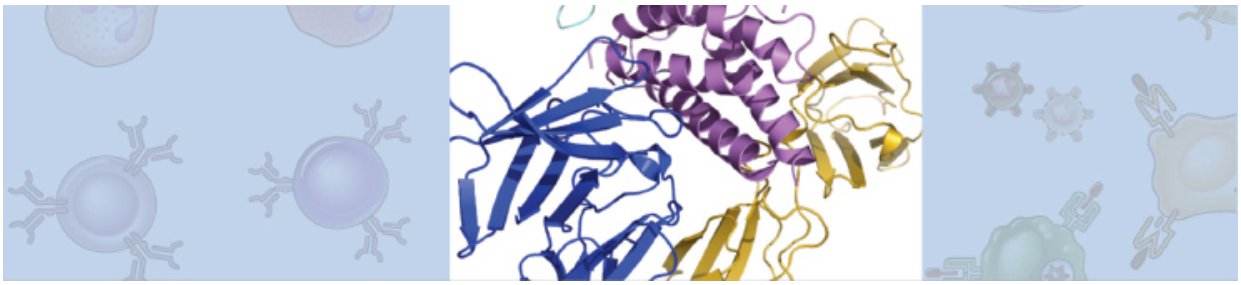
Boehm T: Thymus development and function. *Current Opinion in Immunology* 20 178–184 (2008).
Carpenter A.C.; Bosselut R: Decision checkpoints in the thymus. *Nature Immunology* 11 666–673 (2010).
Godfrey D.I.; Stankovic S.; Baxter A.G: Raising the NKT cell family. *Nature Immunology* 11 197–206 (2010).
Kyewski B.; Klein L: A central role for central tolerance. *Annual Review of Immunology* 24 571–606 (2006).
Maillard I.; Fang T.; Pear W.S: Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway. *Annual Review of Immunology* 23 945–974 (2005).
Rodewald H.R: Thymus organogenesis. *Annual Review of Immunology* 26 355–388 (2008).
Rothenberg E.V.; Moore J.E.; Yui M.A: Launching the T-cell-lineage develop mental programme. *Nature Reviews Immunology* 8 9–21 (2008).
Singer A.; Adoro S.; Park J.H: Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4 versus CD8 lineage choice. *Nature Reviews Immunology* 8 788–801 (2008).
Stritesky G.L.; Jameson S.C.; Hogquist K.A: Selection of self-reactive T cells in the thymus. *Annual Review of Immunology* 30 95–114 (2012).
Taniuchi I.; Ellmeier W: Transcriptional and epigenetic regulation of CD4/CD8 lineage choice. *Advances in Immunology* 110 71–110 (2011).

MicroRNA e maturazione linfocitaria

Lodish H.F.; Zhou B.; Liu G.; Chen C.Z: Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nature Reviews Immunology* 8 120–130 (2008).
O'Connell R.M.; Rao D.S.; Baltimore D: microRNA regulation of inflammatory responses. *Annual Review of i\Immunology* 30 295–312 (2012).
Xiao C.; Rajewsky K: MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell* 136 26–36 (2009).

CAPITOLO

9



Attivazione dei linfociti T

ATTIVAZIONE DEI LINFOCITI T: CARATTERISTICHE GENERALI
SEGNALI CHE ATTIVANO I LINFOCITI T
- Riconoscimento dell'antigene
- Ruolo della costimolazione nell'attivazione dei linfociti T

RISPOSTE FUNZIONALI DEI LINFOCITI T
- Modificazione dell'espressione di molecole di membrana durante l'attivazione dei linfociti T
- Citochine nelle risposte immunitarie adattative
- Secrezione dell'IL-2 ed espressione del suo recettore (IL-2R)
- Espansione clonale dei linfociti T
- Differenziamento dei linfociti T attivati in cellule effettrici
- Sviluppo dei linfociti T della memoria

RISOLUZIONE DELLE RISPOSTE T
RIEPILOGO

Il processo di attivazione dei linfociti T genera, a partire da un piccolo numero di linfociti naïve specifici per un antigene, un grande numero di cellule effettrici dotate della stessa specificità, che funzionano per eliminare quel determinato antigene e una popolazione di cellule della memoria longeve, pronte a reagire rapidamente contro lo stesso antigene nel caso di un successivo incontro. Una caratteristica fondamentale delle risposte dei linfociti T e di tutta l'immunità adattativa è l'elevato grado di specificità per l'antigene. Sia l'attivazione iniziale dei linfociti T naïve sia la successiva risposta dei linfociti T effettori sono scatenate dal riconoscimento dell'antigene da parte del recettore espresso sulla superficie dei linfociti T (*T Cell Receptor*, TCR). Nel Capitolo 6 abbiamo visto che i linfociti Triconoscono in modo specifico frammenti di antigeni proteici associati a molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (*Major Histocompatibility Complex*, MHC). Nel Capitolo 7 abbiamo descritto il recettore per l'antigene e le altre molecole coinvolte nell'attivazione dei linfociti T da parte degli antigeni e i segnali biochimici attivati da questi recettori. In questo capitolo descriveremo la biologia dell'attivazione dei linfociti T. Cominceremo con una breve panoramica dei meccanismi di attivazione, discuteremo quindi il ruolo della costimolazione e degli altri segnali forniti dalle cellule che presentano l'antigene (*Antigen Presenting*

Cells, APC) e descriveremo i processi di proliferazione e differenziamento che avvengono quando i linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$ riconoscono gli antigeni non-self. La generazione e le funzioni dei linfociti $CD4^+$ effettori sono descritti nel Capitolo 10, mentre quelli dei linfociti T $CD8^+$ effettori sono trattati nel Capitolo 11. Pertanto i Capitoli 9, 10 e 11 si occuperanno della biologia dell'attivazione dei linfociti T e della loro funzione nell'immunità cellulo-mediata.

ATTIVAZIONE DEI LINFOCITI T: CARATTERISTICHE GENERALI

L'attivazione dei linfociti T naïve avviene negli organi linfoidi secondari, attraverso i quali queste cellule ricircolano e nei quali possono incontrare gli antigeni presentati dalle cellule dendritiche mature (Fig. 9-1). Nel timo vengono generati cloni di linfociti T, ognuno con una differente specificità, indipendentemente dall'esposizione agli antigeni. I linfociti T naïve (quelli cioè che non hanno ancora riconosciuto e risposto a un antigene) circolano nell'organismo in uno stato di quiescenza e acquistano potenti capacità funzionali solo dopo l'attivazione. Questa attivazione avviene all'interno degli organi linfoidi dove i linfociti T naïve e le APC giungono in stretto contatto (vedi Capp. 2 e 6).

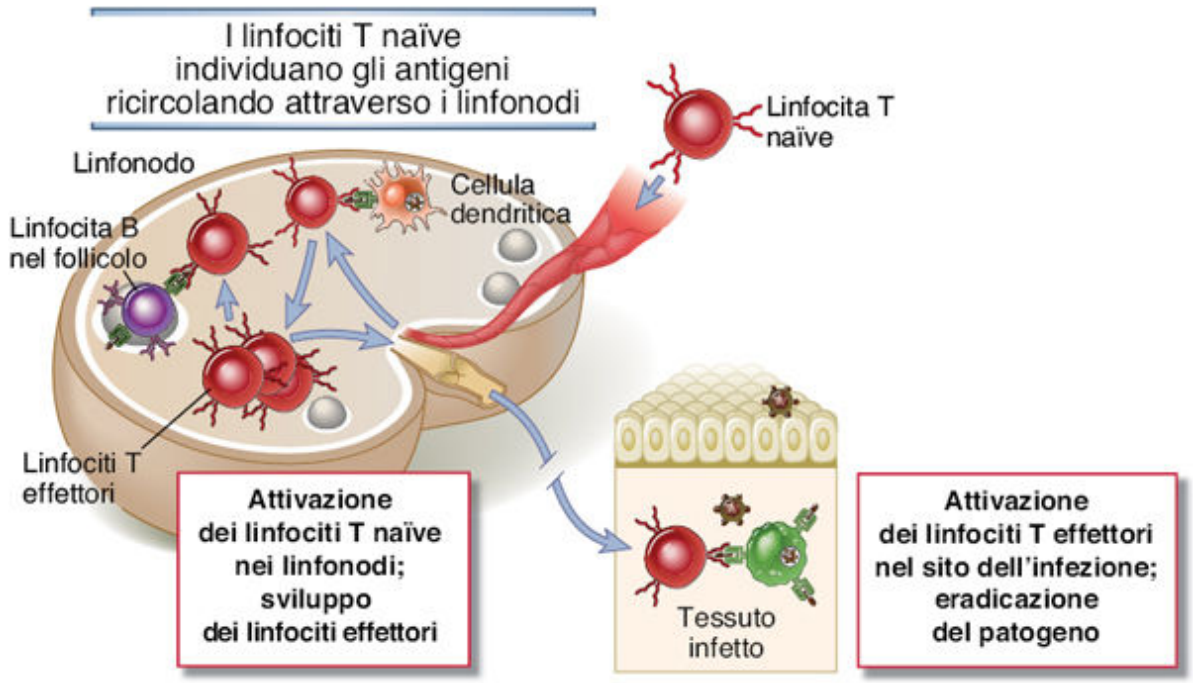


FIGURA 9-1 Attivazione dei linfociti T naïve ed effettori. Le cellule dendritiche trasportano gli antigeni ai linfonodi dove vengono riconosciuti dai linfociti T naïve. I linfociti T attivati si differenziano in linfociti effettori e possono rimanere negli organi linfoidi per stimolare, a loro volta, l'attivazione dei linfociti B oppure migrare nei siti di infezione, dove i linfociti effettori vengono stimolati nuovamente dagli antigeni e svolgono le loro funzioni effettrici, tra cui l'attivazione dei macrofagi.

I linfociti T naïve si muovono all'interno degli organi linfoidi interagendo in modo casuale con molte cellule dendritiche e si fermano solo quando incontrano un antigene per il quale essi esprimono gli specifici recettori. Le cellule dendritiche presenti negli organi linfoidi sono in grado presentare molti tipi di antigeni. I linfociti T sono in costante movimento, guidati principalmente dal network reticolare dei fibroblasti, un substrato-matrice prodotto dalle cellule reticolari fibroblastiche localizzate nell'area T degli organi linfoidi. Il riconoscimento dell'antigene provoca la generazione di segnali biochimici che conducono al rapido arresto dei linfociti T, permettendo la stabilizzazione dell'interazione tra i linfociti T e le APC che esprimono l'antigene e dando il via al processo di attivazione dei linfociti T.

Il riconoscimento dell'antigene, in associazione ad altri stimoli attivatori, induce numerose risposte nei linfociti T: secrezione delle citochine, proliferazione dei cloni antigene-specifici (detta espansione clonale) e differenziamento in linfociti effettori e della memoria (Fig. 9-2).

Inoltre, il processo di attivazione dei linfociti T è associato a cambiamenti nell'espressione di una serie di molecole di membrana, molte delle quali svolgono importanti ruoli nell'indurre e nel regolare le risposte immuni. Le citochine guidano la proliferazione e la differenziazione dei linfociti T attivati dall'antigene. L'espansione clonale e la differenziazione sono favorite da numerosi meccanismi di amplificazione. Per esempio, i linfociti T attivati stimolano le APC, incrementando così ulteriormente la loro abilità di attivare i linfociti T. Contemporaneamente, entrano in gioco anche molecole di membrana e citochine secrete dai linfociti attivati, dotate di funzioni inibitorie che hanno il compito di limitare l'intensità della risposta. Le diverse fasi della risposta dei linfociti T e la natura dei meccanismi di feedback positivo e negativo verranno descritti più avanti in questo capitolo.

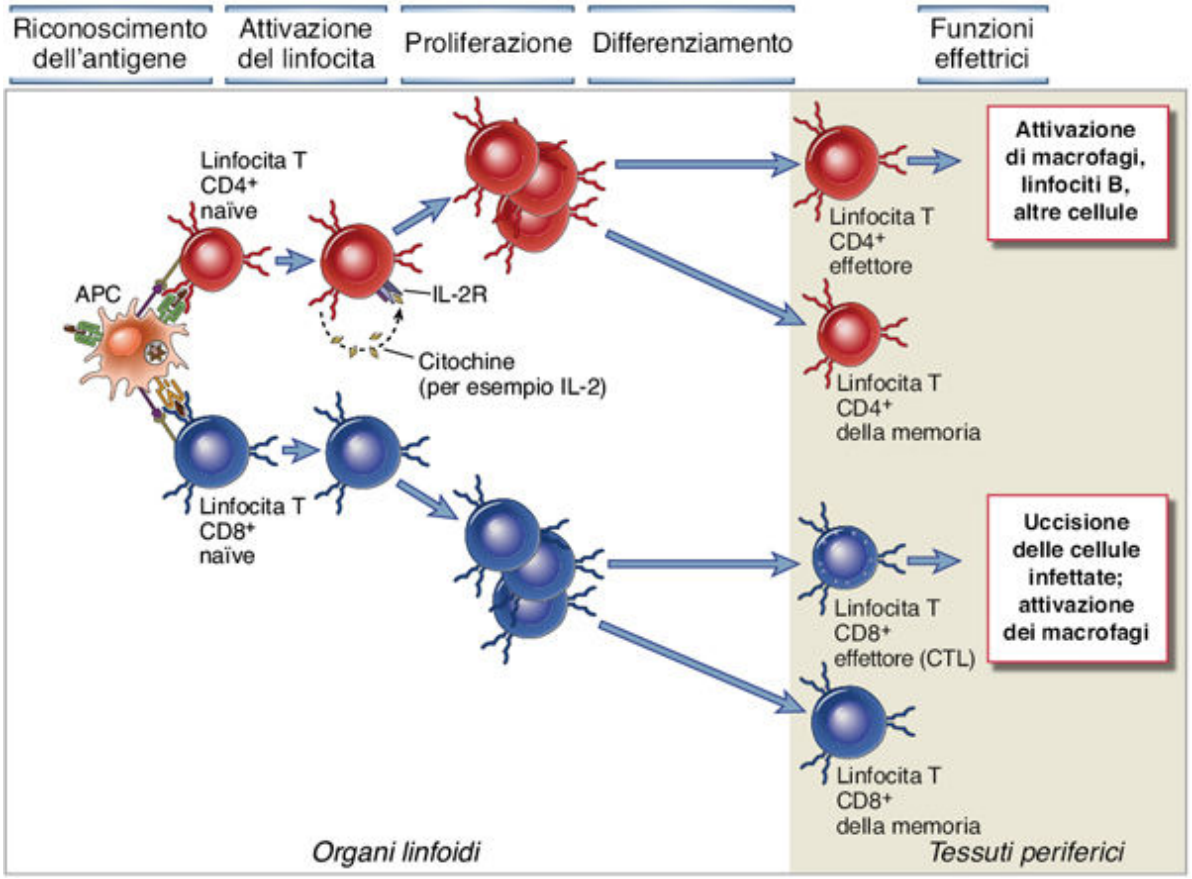


FIGURA 9-2 Fasi della risposta T. Il riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti T induce la secrezione di citochine (per esempio l'IL-2), specialmente da parte dei linfociti T $CD4^+$. Tali citochine, agendo in modo autocrino, inducono l'espansione clonale e il differenziamento dei linfociti T in cellule effettrici o della memoria. Nella fase effettrice della risposta, i linfociti T $CD4^+$ effettori rispondono all'antigene producendo citochine dotate di numerose funzioni, quali l'attivazione e la chemiotassi dei leucociti e l'attivazione dei linfociti B; i meccanismi effettori dei linfociti $CD8^+$ citotossici (CTL) consistono nell'eliminare le cellule infettate.

Le cellule che presentano l'antigene non solo presentano gli antigeni ai linfociti T, ma forniscono anche gli stimoli che determinano la potenza e la qualità della riposta dei linfociti T stessi. Questi stimoli comprendono molecole di membrana e citochine secrete. Differenti tipi di APC possono esprimere segnali distinti che promuovono lo sviluppo di diversi tipi di cellule effettrici. Più avanti in questo capitolo e nel Capitolo 10 descriveremo il ruolo delle APC nell'istruire i linfociti T per la risposta all'antigene.

I linfociti T effettori riconoscono l'antigene negli organi linfoidi o nei tessuti periferici non linfoidi e in questo modo vengono attivati a svolgere quelle funzioni che portano all'eliminazione del patogeno o, in particolari condizioni, a danno tissutale. Mentre i linfociti naïve sono attivati prevalentemente negli organi linfoidi, i linfociti effettori differenziati possono rispondere agli antigeni e svolgere le loro funzioni in qualunque tessuto (Fig. 9-1). Il processo di differenziamento da cellule naïve a cellule effettrici conferisce a queste ultime la capacità di svolgere funzioni specializzate e di migrare verso i tessuti infetti o infiammati. Qui, le cellule effettrici incontrano nuovamente l'antigene e mettono in atto le risposte necessarie per eliminarlo. I linfociti T effettori $CD4^+$ secernono citochine ed esprimono molecole di membrana che possono stimolare altre cellule del sistema immunitario; queste cellule effettrici sono classificate in sottopopolazioni in base al profilo delle citochine prodotte e alle loro funzioni (vedi Cap. 10): alcune di queste cellule attivano i macrofagi così da uccidere i patogeni fagocitati; altre producono citochine che richiamano altri leucociti e stimolano l'infiammazione; altre potenziano le funzioni delle barriere mucosali; altre ancora rimangono negli organi linfoidi e stimolano il differenziamento dei linfociti B a plasmacellule che producono anticorpi. I linfociti T $CD8^+$ citotossici (*Cytotoxic T Lymphocytes*, CTL), infine, ovvero le cellule effettrici della linea $CD8^+$, si occupano invece di uccidere le

cellule infettate e le cellule tumorali che presentano antigeni endogeni associati a molecole MHC di classe I e possono anche secernere citochine che attivano i macrofagi e stimolano i processi infiammatori.

I linfociti T della memoria che sono generati in seguito all'attivazione clonale del linfocita T naïve sono cellule che sopravvivono molto a lungo e sono dotate di una spiccata reattività nei confronti dell'antigene. Queste cellule sono in grado di ricircolare nei tessuti e sono abbondanti nelle mucose, nella cute e negli organi linfoidi. Dopo che la risposta a un determinato antigene è terminata, i linfociti della memoria antigene-specifici che rimangono in circolo sono molto più numerosi di quelli naïve, specifici per lo stesso antigene, che erano presenti prima dello scatenamento della risposta stessa. Le cellule della memoria risponderanno prontamente a un successivo incontro con l'antigene generando ogni volta nuove cellule effettrici.

Le risposte T si esauriscono in seguito all'eliminazione dell'antigene da parte dei linfociti effettori. Questo processo è importante per riportare il sistema immunitario in uno stato di equilibrio o di omeostasi e dipende prevalentemente dal fatto che l'eliminazione dell'antigene priva i linfociti T effettori di un importante segnale di sopravvivenza e ne determina la morte per apoptosi. La eliminazione dell'antigene causa anche lo spegnimento della risposta infiammatoria e l'esaurimento dei segnali costimolatori, inclusa la produzione di citochine. Inoltre, il riconoscimento dell'antigene attiva anche segnali inibitori che hanno la funzione di controllare la portata e la durata della risposta. Tutti questi meccanismi fanno sì che più del 90% dei linfociti che si originano in seguito all'espansione clonale muoia per apoptosi quando l'antigene viene eliminato.

Procederemo ora descrivendo i segnali necessari e le fasi comuni dell'attivazione dei linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$. Quindi, concluderemo trattando in maniera più dettagliata le cellule della memoria e analizzando i meccanismi che portano allo spegnimento della risposta immune una volta che l'antigene è stato eliminato.

SEGNALI CHE ATTIVANO I LINFOCITI T

Per permettere la proliferazione dei linfociti T e il loro differenziamento in cellule effettrici e della memoria sono necessari il riconoscimento dell'antigene, la costimolazione e la presenza di citochine. In questo paragrafo descriveremo la natura degli antigeni riconosciuti dai linfociti T e le molecole costimolatorie con i rispettivi recettori. Le citochine verranno trattate più avanti in questo capitolo e nel Capitolo 10.

Riconoscimento dell'antigene

L'antigene è sempre il primo segnale necessario per l'attivazione dei linfociti, nonché l'elemento in grado di garantire la specificità della susseguente risposta immunitaria. I linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$ riconoscono complessi peptide-MHC presentati dalle APC e per questo possono rispondere solo ad antigeni proteici che danno origine ai peptidi attraverso un processo definito processazione. Oltre al TCR, che riconosce i peptidi associati alle molecole MHC, molte altre proteine di membrana prendono parte al processo di attivazione dei linfociti T (vedi Fig. 7-9). Queste includono le molecole di adesione, che stabilizzano l'interazione fra il linfocita e l'APC, i corecettori che inviano segnali biochimici che integrano i segnali provenienti dal complesso del TCR e le molecole costimolatorie, che verranno descritte più avanti. I segnali biochimici attivati dal recettore per l'antigene e i corecettori sono stati discussi nel Capitolo 7.

L'attivazione dei linfociti T naïve richiede il riconoscimento dell'antigene presentato dalle cellule dendritiche. Il ruolo critico delle cellule dendritiche nell'iniziare la risposta dei linfociti T è dovuto al fatto che queste APC si trovano nel luogo anatomico appropriato per interagire con i linfociti T naïve (vedi Cap. 6). L'attivazione dei linfociti T naïve dipende anche da molecole costimolatorie (vedi più avanti) che sono espresse in quantità sulle cellule dendritiche. Gli antigeni proteici che attraversano le barriere epiteliali o sono prodotti nei tessuti, sono catturati dalle cellule dendritiche e trasportati ai linfonodi. Gli antigeni che entrano in circolo possono essere catturati dalle cellule dendritiche nella milza. Se questi antigeni sono componenti di patogeni o sono somministrati come adiuvanti (come nei vaccini) viene stimolata l'immunità innata che porta all'attivazione delle cellule dendritiche e all'espressione delle molecole costimolatorie. Le cellule dendritiche, che presentano sulla loro superficie

gli antigeni catturati, migrano nelle zone degli organi linfoidi secondari ove transitano i linfociti T. Come discusso nel Capitolo 6, sia i linfociti T naïve sia le cellule dendritiche mature sono attirati in queste aree degli organi linfoidi secondari da chemochine prodotte localmente che attivano un recettore specifico chiamato CCR7. Quando le cellule dendritiche mature raggiungono le aree T, esse presentano i peptidi associati alle molecole MHC ed esprimono anche le molecole costimolatorie. Le cellule dendritiche montano sulle molecole MHC di classe II i peptidi che derivano dagli antigeni esogeni catturati mediante endocitosi e li presentano ai linfociti T $CD4^+$ naïve; i peptidi che originano da proteine citosoliche e nucleari sono invece presentati da molecole MHC di classe I ai linfociti T $CD8^+$ (vedi Cap. 6).

I linfociti T effettori possono anche rispondere ad antigeni presentati da cellule diverse dalle cellule dendritiche. Nelle risposte immunitarie umorali, i linfociti B presentano gli antigeni ai linfociti T helper e contemporaneamente ne ricevono segnali attivatori (vedi Cap. 12); nelle risposte immunitarie cellulo-mediate sono i macrofagi a presentare gli antigeni ai linfociti T $CD4^+$ e a esserne a loro volta stimolati (vedi Cap. 10); inoltre, virtualmente, qualunque cellula nucleata può presentare antigeni ai $CD8^+$ CTL ed essere da essi uccisa (vedi Cap. 11).

Ruolo della costimolazione nell'attivazione dei linfociti T

Oltre al riconoscimento dell'antigene, per la proliferazione e il differenziamento dei linfociti T naïve sono necessari segnali, detti costimolatori, forniti da molecole espresse dalle APC (Fig. 9-3). La necessità di segnali costimolatori per permettere tali proliferazione e differenziamento fu inizialmente suggerita da esperimenti nel corso dei quali si osservò che i segnali di attivazione innescati dal solo recettore per l'antigene dei linfociti T (per esempio simulando il riconoscimento di un antigene mediante il cross-link dei complessi TCR-CD3 causato da anticorpi anti-CD3) risultava in una riposta molto più debole rispetto a quelle ottenute utilizzando antigeni presentati da APC attivate. Ciò suggeriva che le APC, oltre all'antigene, esprimessero molecole importanti per l'attivazione dei linfociti T. Queste molecole sono oggi note come **molecole costimolatorie**, mentre il (*secondo*) segnale di attivazione da esse attivato è definito

costimolazione, in quanto collabora con l'antigene (*primo segnale*) nello stimolare in modo ottimale l'attivazione dei linfociti T. In assenza di costimolazione, il linfocita T può non rispondere e morire per apoptosi oppure entrare in uno stato di prolungata non responsività (vedi Cap. 15).

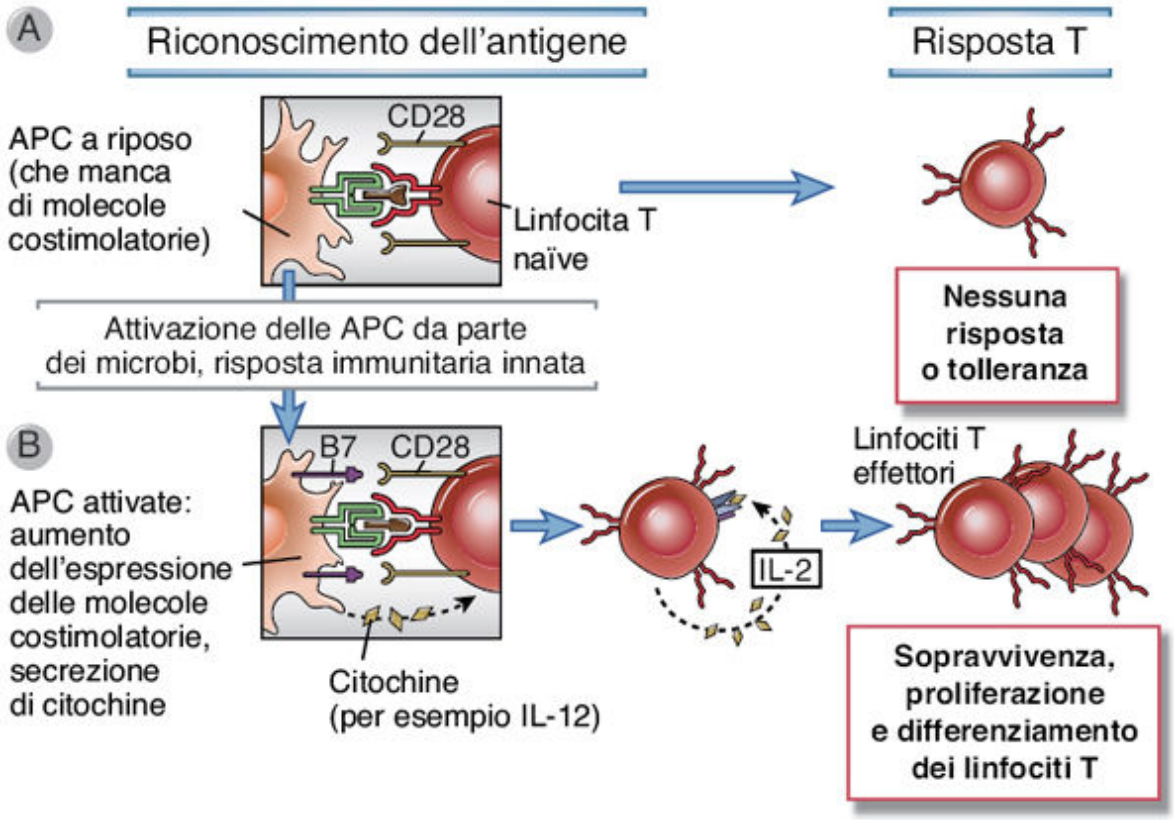


FIGURA 9-3 Funzioni delle molecole costimolatorie nell'attivazione dei linfociti T. A. Le APC in condizioni di riposo (per esempio cellule dendritiche che presentano gli antigeni self) esprimono poche o nessuna molecola costimolatoria e non sono in grado di stimolare i linfociti T naïve. (Talvolta il riconoscimento dell'antigene in assenza di segnali costimolatori rende la cellula non responsiva o tollerante; questo fenomeno sarà discusso nel Cap. 15.) **B.** I patogeni e le citochine secrete durante la risposta immunitaria innata stimolano l'espressione delle molecole costimolatorie, quali le molecole B7, da parte delle APC. Le APC (che generalmente presentano gli antigeni che derivano da patogeni) acquisiscono la capacità di attivare in modo ottimale i linfociti T naïve e producono citochine, come l'interleuchina-12 (IL-12), che stimolano il differenziamento in cellule effettrici.

Molecole costimolatorie della famiglia B7:CD28

La via di costimolazione meglio caratterizzata nei linfociti T è quella attivata dal recettore CD28, il quale lega le molecole costimolatorie B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) espresse dalle APC attivate. CD28 fu scoperto analizzando la capacità di una batteria di anticorpi, in grado di riconoscere

molecole di superficie di linfociti T umani, di potenziare le risposte T attivate da anticorpi anti-CD3. L'identificazione di CD28 fu presto seguita da quella dei suoi ligandi, chiamati B7 e che si sono dimostrati successivamente essere due proteine omologhe, denominate B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86). Il ruolo cruciale di CD28, B7-1 e B7-2 (spesso denominati collettivamente B7) nell'attivazione dei linfociti T è testimoniata anche dalle gravi immunodeficienze che si sviluppano in topi in cui sono stati deleti (topi knockout) i geni che codificano per queste proteine e dalla capacità di inibire le risposte T linfocitarie da parte di agenti che legano e bloccano le molecole B7. Più avanti, descriveremo come queste osservazioni possano essere sfruttate per sviluppare nuovi agenti terapeutici.

B7-1 e B7-2 sono glicoproteine integrali di membrana simili tra loro dal punto di vista strutturale e caratterizzate dalla presenza di due domini extracellulari di tipo immunoglobulinico. CD28 è un omodimero le cui catene, unite da un ponte disolfuro, possiedono un singolo dominio immunoglobulinico extracellulare. Nell'uomo, CD28 è espresso da più del 90% del linfociti T $CD4^+$ e dal 50% dei linfociti T $CD8^+$, mentre nel topo è presente in tutti i linfociti T naïve.

L'espressione delle molecole B7 è regolata in modo da garantire che le risposte T vengano iniziate solo quando esse siano necessarie. Le molecole B7 sono espresse prevalentemente dalle APC (cellule dendritiche, macrofagi e linfociti B) attivate da prodotti microbici che legano i recettori Toll-like o da citochine quali l'interferone-γ (IFN-γ), prodotto durante la risposta ai microbi. Le molecole B7 sono invece assenti o espresse a bassi livelli sulle APC non attivate. Dunque, l'induzione delle molecole costimolatorie da parte di microbi e citochine dell'immunità innata promuove la risposta T agli antigeni microbici, rappresentando un eccellente esempio del ruolo che l'immunità innata ha nel potenziamento della risposta adattativa (vedi Cap. 4). Inoltre, gli stessi i linfociti T $CD4^+$ attivati stimolano l'espressione delle molecole costimolatorie B7 sulle APC attraverso una via di amplificazione del segnale che dipende da CD40 e fornisce un feedback continuo che serve a potenziare le risposte dei linfociti T (vedi più avanti). Tra le APC, le cellule dendritiche mature esprimono i più alti livelli di molecole costimolatorie e rappresentano dunque i più potenti attivatori dei linfociti T naïve. L'espressione di B7-1 e B7-2 è regolata in modo diverso; B7-2 è espressa costitutivamente a bassi livelli e viene indotta rapidamente in

seguito all'attivazione delle APC, mentre l'espressione di B7-1 è presente solo successivamente (ore o giorni) all'inizio della risposta.

Nel Capitolo 6 abbiamo accennato al ruolo fondamentale degli **adiuvanti** nell'attivazione della risposta primaria dei linfociti T agli antigeni proteici, come per esempio quella ai vaccini. Molti adiuvanti sono prodotti microbici (o che mimano microbi) e funzionano principalmente stimolando l'espressione di molecole costimolatorie sulle APC.

In condizioni normali, le APC non attivate (*resting*) presenti nei tessuti possono presentare gli antigeni self a linfociti T potenzialmente autoreattivi ma questi, in presenza di bassi livelli di molecole costimolatorie, non solo non vengono attivati ma possono diventare non responsivi in modo permanente (vedi Cap. 15). Anche la produzione e il mantenimento di linfociti T regolatori, che sono importanti per la tolleranza nei confronti degli antigeni self (vedi Cap. 15), dipendono dalla costimolazione B7:CD28. È verosimile che i bassi livelli di molecole B7 costitutivamente espresse dalle APC agiscano insieme agli antigeni self presentati da queste APC per garantire la sopravvivenza dei linfociti T regolatori.

I segnali attivati da CD28 agiscono in cooperazione con il riconoscimento dell'antigene per promuovere la sopravvivenza, la proliferazione e la differenziazione dei linfociti T antigene-specifici. I segnali costimolatori attivati da CD28 amplificano anche le vie di trasduzione indotte a valle del recettore dei linfociti T (vedi Cap. 7) e possono dare il via a ulteriori segnali che cooperano con quelli attivati dal TCR (Fig. 9-4). La chinasi PI3 viene reclutata alla coda citoplasmatica di CD28 e ciò a sua volta attiva la chinasi Akt, che permette la sopravvivenza del linfocita T attivato, e gli enzimi Itk e PLCγ, che provocano l'aumento della concentrazione di calcio intracellulare. CD28 contribuisce anche all'attivazione della chinasi JNK MAP attraverso la via che coinvolge la proteina G Rac potenziando l'attivazione di NF-κB. Nel loro complesso l'attivazione di queste vie di trasduzione determina: l'aumentata espressione di proteine anti-apoptotiche come Bcl-2 e Bcl-xL, che promuovono la sopravvivenza del linfocita T; l'aumentata attività metabolica e la proliferazione dei linfociti T; la produzione di citochine, tra le quali l'IL-2, e il differenziamento dei linfociti T in cellule effettrici e della memoria. I linfociti T effettori e della memoria sono meno dipendenti dalla costimolazione mediata da B7:CD28 rispetto alle cellule naïve. Ciò permette

loro di rispondere ad antigeni presentati dalle APC localizzate nei tessuti non linfoidi che esprimono bassi o nulli livelli di B7. Per esempio, il differenziamento dei linfociti T $CD8^+$ in CTL effettori richiede la costimolazione, ma i CTL effettori possono riconoscere e uccidere cellule che non esprimono molecole costimolatorie.

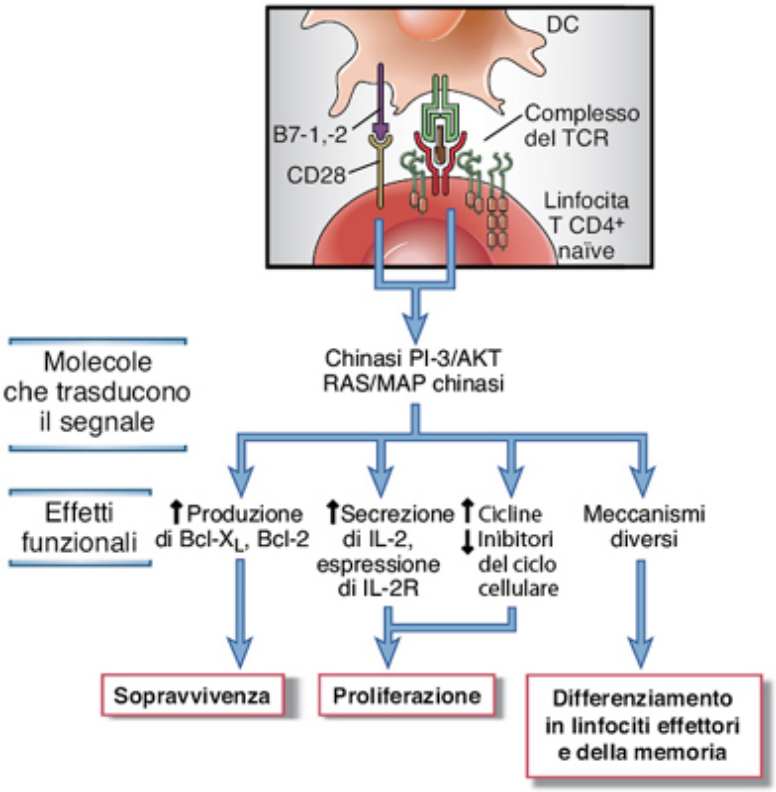


FIGURA 9-4 Ruolo di CD28 nella costimolazione dei linfociti T. L'ingaggio di CD28 produce segnali stimolatori che si integrano e potenziano quelli generati dal TCR. Questa attivazione porta all'espressione di proteine che permettono la sopravvivenza dei linfociti, di citochine e dei loro recettori, che promuovono la proliferazione e il differenziamento in linfociti effettori e della memoria attraverso l'attivazione di vari fattori di trascrizione (non mostrato in figura; vedi Capitoli 10 e 11). Questi eventi differenziativi possono dipendere dall'aumentata espansione clonale e possono anche implicare un'aumentata produzione di fattori trascrizionali.

Sono stati identificati molti recettori omologhi a CD28 e molti ligandi omologhi alle molecole B7, alcuni dei quali potenziano le risposte, mentre altri le spengono (Fig. 9-5). La dimostrazione dell'importanza di B7 e CD28 ha stimolato la ricerca in questo campo, portando all'identificazione di molte altre proteine strutturalmente correlate. Sorprendentemente si scoprì che, mentre alcune delle proteine che fanno parte di queste famiglie sono coinvolte nell'attivazione dei linfociti T (e sono dunque dei costimolatori),

altre svolgono invece una funzione inibitoria (e vengono talora chiamati *coinibitori*). Oltre a CD28, il recettore costimolatorio meglio caratterizzato è **ICOS** (*Inducible COStimulator*, CD278). Il suo ligando, ICOS-L (CD275), è espresso da cellule dendritiche, linfociti B e altre popolazioni cellulari. Il recettore ICOS gioca un ruolo essenziale nelle risposte anticorpali T-dipendenti e in modo particolare nelle reazioni che avvengono nei centri germinativi, essendo necessario per lo sviluppo e l'attivazione dei linfociti T helper follicolari che sono essenziali per la formazione dei centri germinativi e quindi per la generazione di linfociti B a elevata affinità (vedi Cap. 12).

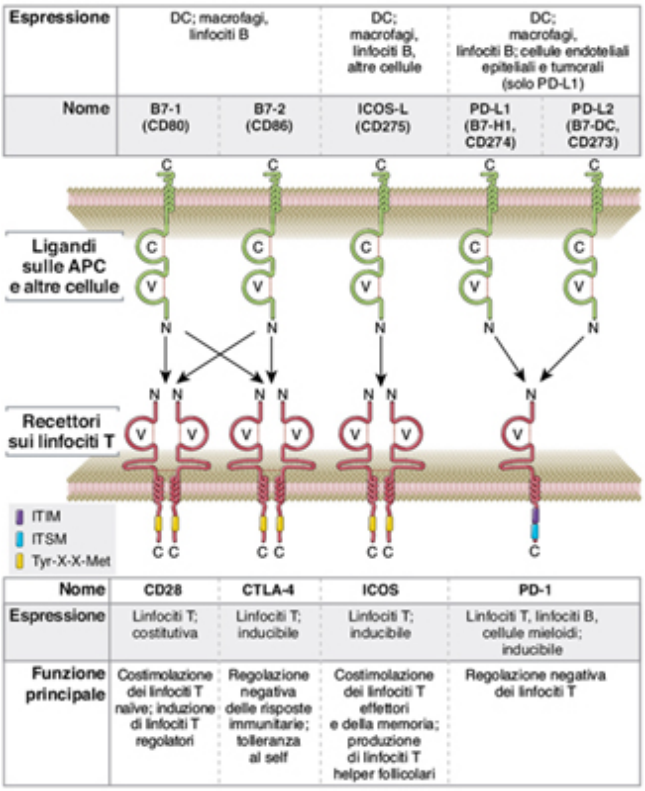


FIGURA 9-5 I principali membri delle famiglie B7 e CD28. La figura mostra i ligandi della famiglia di B7 che sono espressi dalle APC e i loro recettori, appartenenti alla famiglia di CD28, che sono espressi dai linfociti T. Sono anche descritti i loro profili di espressione e le principali funzioni. Sono state identificate anche altre molecole omologhe a B7, quali B7-H3 e B7-H4. Pur essendo ampiamente distribuite, per tali molecole non è ancora stato esattamente chiarito il ruolo fisiologico. Sono infine noti altri recettori inibitori, come per esempio BTLA, ma non essendo omologhi a CD28 non sono stati inseriti in questo schema. DC, cellule dendritiche.

L'attivazione di un linfocita T dipende quindi dall'equilibrio tra i recettori attivatori e quelli inibitori della famiglia CD28. I recettori inibitori sono **CTLA-4** (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*) e **PD-1** (*Programmed*

*Death **1***). (Si noti come questi nomi non riflettano correttamente la distribuzione né la funzione di queste proteine.) Il concetto che l'entità di una risposta immunitaria possa dipendere dall'equilibrio tra recettori attivatori e inibitori è stato già trattato nel Capitolo 4, descrivendo le cellule natural killer (NK) (vedi Fig. 4-8). Un concetto simile si applica alle risposte dei linfociti T e B, sebbene i recettori in questione siano diversi. Dal momento che CTLA-4 e PD-1 sono importanti per il fenomeno della tolleranza e che le anomalie nella loro espressione o nella loro funzione conducono allo sviluppo di malattie autoimmuni, essi verranno trattati nel Capitolo 15 nell'ambito della tolleranza immunologica e dell'autoimmunità. Per il momento, è sufficiente sottolineare che CD28 e CTLA-4 rappresentano l'esempio perfetto di recettori che, pur essendo specifici per lo stesso ligando (le molecole B7), svolgono ruoli opposti nell'attivazione dei linfociti T. CTLA-4 è un recettore ad alta affinità per le molecole B7 che viene di solito ingaggiato quando i livelli di B7 espressi dalle APC sono bassi (come per esempio sulle APC non attivate che presentano antigeni self). CD28, avendo un'affinità per le molecole B7 da 20 a 50 volte inferiore rispetto a quella di CTLA-4, è invece solitamente ingaggiato quando i livelli di espressione di B7 sono relativamente alti (per esempio in presenza di patogeni). Secondo questo modello il livello di espressione di B7 sulle APC, basso in presenza di antigeni self, alto se sono presenti patogeni, determina rispettivamente l'ingaggio di CTLA-4 o di CD28; questo determinerà la soppressione (quando viene legato CTLA-4) o l'attivazione (se il recettore legato è CD28) della risposta immune. Una volta ingaggiato, CTLA-4 può inibire competitivamente il legame delle molecole B7 a CD28, oppure può rimuovere le B7 dalla superficie dell'APC, o ancora generare segnali inibitori in grado di bloccare quelli attivatori originati dal TCR e da CD28 (vedi Cap. 15).

Sebbene molte delle molecole costimolatorie e dei recettori inibitori possano avere funzioni sovrapponibili, i principali ruoli fisiologici dei differenti membri di queste famiglie possono essere differenti. Si ritiene che l'interazione CD28:B7 sia estremamente importante per l'inizio delle risposte T in seguito all'attivazione dei linfociti T naïve; le interazioni ICOS:ICOS-ligando sono invece critiche per le risposte anticorpali che dipendono dai linfociti T helper, mentre le interazioni CTLA-4:B7 inibiscono l'attivazione dei linfociti T negli organi linfoidi secondari e,

infine, le interazioni PD1:PD-ligando inibiscono l'attivazione delle cellule effettrici, specialmente nei tessuti periferici.

Altre vie di costimolazione

In vitro, altre molecole espresse dai linfociti T (come per esempio CD2 e le integrine) si sono dimostrate capaci di generare segnali costimolatori, ma la loro importanza fisiologica nell'attivazione dei linfociti T è meno chiara rispetto a quella dei membri della famiglia di CD28. Le funzioni delle proteine appartenenti alla famiglia di CD2 sono state descritte nel Capitolo 7 e quelle delle integrine nel Capitolo 3. Molti dei recettori appartenenti alla estesa famiglia del recettore del fattore di necrosi tumorale (*Tumor Necrosis Factor Receptor*, TNFR) e i loro ligandi, omologhi al TNF, possono stimolare o inibire i linfociti T in diverse condizioni sperimentali. Molti di questi recettori sono espressi dai linfociti T attivati e si ritiene che siano coinvolti nello sviluppo, nel mantenimento e nelle funzioni delle cellule effettrici. OX40 (CD134) è un membro della famiglia TNFR espresso dai linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$ che ha la funzione di permettere la sopravvivenza cellulare e di prolungare nel tempo la risposta immune. Il suo ligando è espresso dalle APC attivate. Un altro importante membro di questa famiglia, implicato nella stimolazione piuttosto che nella soppressione delle risposte linfocitarie, è 4-1BB (CD137), anch'esso espresso dai linfociti T attivati. Alcuni membri della famiglia del TNFR, come CD27, sono espressi dai linfociti T della memoria; la loro funzione fisiologica non è definita. Il ruolo di queste proteine nel controllo delle risposte fisiologiche e patologiche costituisce una importante area di ricerca.

L'interazione del ligando di CD40 (CD40L) espresso dai linfociti T con CD40 espresso dalle APC potenzia le risposte T indirettamente, grazie all'attivazione delle APC. CD40L è una proteina di membrana appartenente alla superfamiglia del TNF espressa principalmente dai linfociti T attivati, mentre CD40 è un membro della superfamiglia del TNFR espresso da linfociti B, macrofagi e cellule dendritiche. Il ruolo di CD40 nell'attivazione macrofagica nel corso della risposta immunitaria cellulo-mediata e nell'attivazione dei linfociti B durante la risposta umorale sarà descritto rispettivamente nei Capitoli 10 e 12. I linfociti T helper attivati esprimono CD40L, il quale ingaggia CD40 sulle APC e le stimola, ovvero ne potenzia

l'azione, aumentando l'espressione di molecole B7 e la secrezione di citochine come l'IL-12, che promuove il differenziamento dei linfociti T (Fig. 9-6). Questo fenomeno viene talora chiamato *licensing* perché i linfociti T attivati rendono capaci (in inglese *to license*) le APC di stimolare in modo più efficiente le risposte immunitarie. Quindi possiamo concludere che, sebbene CD40L di per sé non funzioni da molecola costimolatoria per i linfociti T, l'attivazione di CD40 amplifica indirettamente le risposte T grazie all'induzione di molecole costimolatorie sulle APC.

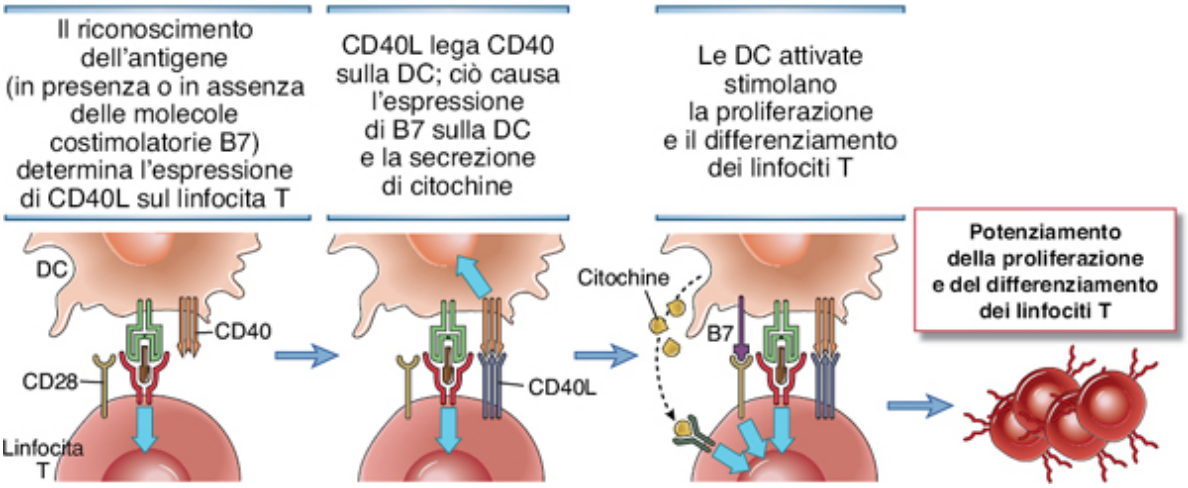


FIGURA 9-6 Ruolo di CD40 nell'attivazione dei linfociti T. I linfociti T naïve sono attivati dai complessi MHC-peptide presenti sulle cellule che presentano l'antigene (APC) attivate in seguito al riconoscimento di patogeni. L'interazione tra complesso MHC-peptide e TCR, congiuntamente con un certo livello di costimolazione (non mostrato in figura) induce l'espressione del ligando di CD40 (CD40L) sui linfociti T attivati. CD40L si lega a CD40 espresso dalle APC e stimola l'espressione di molecole B7 e la secrezione di citochine che attivano i linfociti T. Pertanto, l'espressione di CD40L da parte dei linfociti migliora la capacità di presentare l'antigene da parte delle APC, favorendo e amplificando l'attivazione dei linfociti T.

Inibizione terapeutica della costimolazione

La comprensione dei meccanismi mediati dai segnali di costimolazione ha permesso lo sviluppo di nuovi agenti terapeutici in grado di modulare le risposte immunitarie (Fig. 9-7). La proteina di fusione CTLA-4-Ig è composta dal dominio extracellulare di CTLA-4 legato alla porzione Fc delle immunoglobuline G (IgG) umane ed è in grado di legare le molecole B7-1 e B7-2, bloccandone l'interazione con CD28. La porzione extracellulare di CTLA-4 è stata preferita a quella di CD28 per la maggiore affinità per le molecole B7, mentre l'aggiunta della porzione Fc delle IgG contribuisce ad

aumentare l'emivita della proteina *in vivo*. L'utilizzo di CTLA-4-Ig è stato approvato per il trattamento dell'artrite reumatoide e del rigetto dei trapianti, ed è attualmente in fase di sperimentazione clinica per il trattamento di altre malattie infiammatorie, come la psoriasi e il morbo di Crohn. Anche gli inibitori dell'interazione CD40L:CD40 sono oggetto di studi clinici per prevenire il rigetto dei trapianti e per il trattamento di malattie croniche infiammatorie.

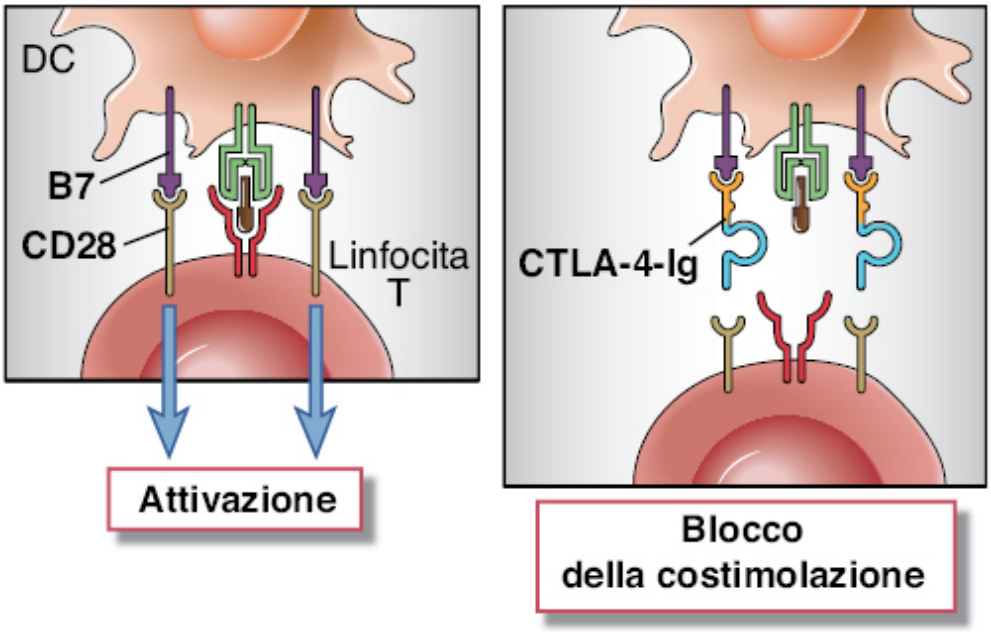


FIGURA 9-7 Meccanismo d'azione di un inibitore delle molecole costimolatorie utilizzato a scopo terapeutico. Una proteina di fusione composta dalla porzione extracellulare di CTLA-4 e dalla coda Fc di una IgG può essere usata per legare e bloccare le molecole B7, bloccandone l'interazione con il recettore attivatorio CD28 e inibendo così l'attivazione dei linfociti T.

Anticorpi capaci di bloccare i recettori inibitori CTLA-4 e PD-1 sono invece stati approvati o sono nelle fasi finali di sperimentazione clinica nell'immunoterapia dei tumori. Questi anticorpi agiscono rimuovendo i meccanismi che riducono l'attivazione dei linfociti T e consentendo l'instaurarsi di risposte anti-tumorali più efficaci (vedi Cap. 18). Il blocco di questi recettori inibitori tuttavia, come era facile prevedere conoscendo il ruolo di CTLA-4 nel mantenimento della tolleranza, induce reazioni autoimmuni in un certo numero di pazienti.

RISPOSTE FUNZIONALI DEI LINFOCITI T

Subito dopo il riconoscimento dell'antigene, i linfociti T vanno incontro a modificazioni nell'espressione delle molecole di membrana, quali i recettori delle citochine, così come nella secrezione di citochine. Successivamente avviene la proliferazione dei T linfociti, che è in gran parte guidata dalle citochine secrete, e il differenziamento di queste cellule in linfociti effettori e della memoria. Descriveremo gli aspetti molecolari e funzionali di ciascuno di questi passaggi.

Modificazione dell'espressione di molecole di membrana durante l'attivazione dei linfociti T

L'attivazione dei linfociti T è provocata dal riconoscimento dell'antigene e dal legame delle molecole costimolatorie. Gli avvenimenti iniziali di questa fase si associano a caratteristici cambiamenti nell'espressione di diverse molecole di membrana. Questi fenomeni, che sono stati meglio caratterizzati nei linfociti T CD4$^+$ helper (Fig. 9-8), hanno un importante significato, dal momento che molte delle molecole espresse dai linfociti T, successivamente al riconoscimento dell'antigene e alla costimolazione, sono anche coinvolte nella ottimizzazione delle funzioni di queste cellule. Di seguito vengono riportati alcuni esempi.

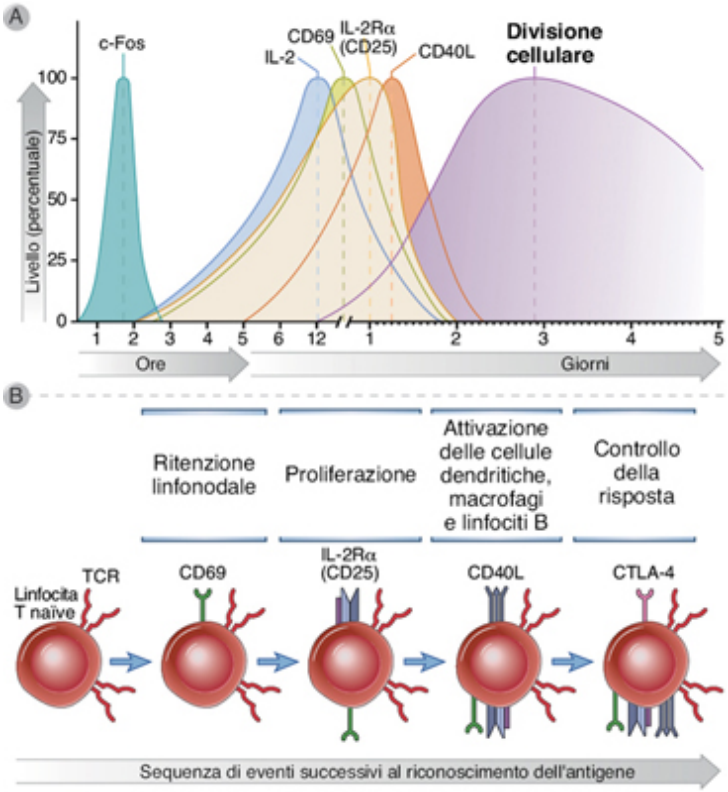


FIGURA 9-8 Modificazioni nell'espressione di alcune proteine di membrana durante l'attivazione dei linfociti T. A. Rappresentazione schematica della cinetica di espressione di alcune molecole nelle fasi successive all'attivazione dei linfociti T da parte dell'antigene in presenza di molecole costimolatorie. Gli esempi mostrati includono un fattore di trascrizione (c-Fos), una citochina (IL-2) e molecole di membrana. Queste proteine sono espresse a bassi livelli nei linfociti T naïve e vengono indotte in seguito all'attivazione. CTLA-4 viene espresso 1-2 giorni dopo l'attivazione. Le cinetiche mostrate sono delle stime e possono variare a seconda della natura, della concentrazione, della persistenza dell'antigene e del tipo di adiuvante. **B.** Le principali funzioni di alcune delle molecole di membrana (vedi la descrizione nel testo). CD40L, ligando di CD40; IL-2R, recettore per IL-2.

- ***CD69.*** L'espressione di questa proteina di membrana aumenta nell'arco di poche ore. CD69, legandosi al recettore per la sfingosina 1-fosfato (*Sphingosine 1-Phosphate Receptor*, S1PR1), ne riduce l'espressione. Dal momento che il ruolo di S1PR1, già descritto nel Capitolo 3, è di facilitare la fuoriuscita dei linfociti T dagli organi linfoidi, la diminuzione della sua espressione provocherà una maggiore ritenzione dei linfociti T attivati negli organi linfoidi, evento importante affinché questi possano ricevere i segnali necessari per la proliferazione e il differenziamento. Quando i T linfociti iniziano a proliferare, l'espressione di CD69 diminuisce e nel linfocita T, che è a questo punto

attivato, l'espressione di S1PR1 torna ad aumentare, favorendo così la fuoriuscita dei linfociti effettori e della memoria dagli organi linfoidi (vedi Cap. 3).

- ***CD25 (IL-2Rα).*** L'espressione di questo recettore rende i linfociti T attivati capaci di rispondere a IL-2, citochina cruciale per la crescita di queste cellule. Questo processo verrà descritto più avanti.
- ***CD40L (CD154).*** Nelle 24-48 ore successive al riconoscimento dell'antigene, i linfociti T cominciano a esprimere elevati livelli di CD40L. Ciò consente loro di esercitare le proprie funzioni effettrici, ovvero coadiuvare l'azione dei macrofagi e dei linfociti B. Inoltre, come discusso precedentemente, l'espressione di CD40L da parte dei linfociti T attiva le cellule dendritiche stimolandole a divenire APC più efficaci; questo circuito è un meccanismo di feedback positivo di amplificazione delle risposte T.
- ***CTLA-4 (CD152).*** Anche l'espressione di CTLA-4 aumenta nelle 24-48 ore successive il riconoscimento dell'antigene. Questa molecola, membro della famiglia di CD28, è nota per la sua capacità di inibire l'attivazione linfocitaria e di regolare la risposta T. Il meccanismo di azione di CTLA-4 sarà descritto più dettagliatamente nel Capitolo 14 (vedi Fig. 14-5).
- ***Molecole di adesione e recettori per le chemochine.*** Durante l'attivazione, i linfociti T riducono l'espressione delle molecole che ne permettono l'ingresso negli organi linfoidi (come per esempio la L-selectina [CD62L] e il recettore chemochinico CCR7) e aumentano l'espressione delle molecole necessarie per la loro migrazione nei siti periferici sedi di infezioni e di danno tissutale (come per esempio le integrine LFA-1 e VLA-4, i ligandi per la E- e la P-selectina e diversi recettori per chemochine). Queste molecole e il loro ruolo nella migrazione dei linfociti T sono stati descritti nel Capitolo 3. L'attivazione, infine, aumenta anche l'espressione di CD44, il recettore per l'acido ialuronico (un componente della matrice extracellulare), che contribuisce a trattenere i linfociti T effettori nei tessuti sede di infezione o danneggiati (vedi Cap. 10).

Citochine nelle risposte immunitarie adattative

Le citochine svolgono un ruolo critico nell'immunità adattativa; alcune delle loro caratteristiche generali, possono essere così riassunte

- Nella risposta immunitaria adattativa, la maggiore quantità e la più estesa varietà di citochine è prodotta dai linfociti T $CD4^+$ helper, ma anche le citochine prodotte dai linfociti T $CD8^+$ e dai linfociti B svolgono importanti funzioni. Le citochine secrete dalle cellule dendritiche e da altre APC svolgono funzioni decisive nelle sviluppo delle risposte T.
- Le citochine prodotte durante le risposte immunitarie adattative sono coinvolte nella proliferazione e nella differenziazione dei linfociti T e B attivati dal riconoscimento dell'antigene e nelle funzioni effettrici dei linfociti T.
- La maggior parte di queste citochine agisce sulle stesse cellule che le producono (azione autocrina) o sulle cellule viciniori (azione paracrina).

Il ruolo delle citochine nelle funzioni effettrici dei linfociti T è descritto nei Capitoli 10 e 11. Qui discuteremo l'interleuchina-2, il prototipo delle citochine prodotte dai linfociti T dotate di azione autocrina.

Secrezione dell'IL-2 ed espressione del suo recettore (IL-2R)

L'interleuchina-2 (IL-2) è un fattore di crescita, di sopravvivenza e di differenziamento dei linfociti T e svolge un ruolo fondamentale nell'attivazione della risposta T e nel controllo delle risposte immunitarie. L'IL-2 era in origine nota come *fattore di crescita dei linfociti T* (*T Cell Growth Factor*, TCGF), data la sua capacità di supportare la proliferazione dei linfociti T attivati. Essa agisce sulle stesse cellule che la rilasciano o su cellule adiacenti, funzionando quindi in maniera autocrina o paracrina.

L'IL-2 è prodotta prevalentemente dai linfociti T $CD4^+$ dopo il riconoscimento dell'antigene e il legame con le molecole costimolatorie. L'attivazione dei linfociti T induce la trascrizione del gene per l'IL-2, nonché la sintesi e la secrezione di questa glicoproteina. La produzione di IL-2 è rapida e transitoria: inizia entro 1 o 2 ore dal riconoscimento dell'antigene, raggiunge il picco a 8-12 ore e si esaurisce entro le 24 ore. I

linfociti T $CD4^+$ liberano l'IL-2 nella sinapsi immunologica formata con la APC (vedi Cap. 7), dove tende a localizzarsi anche il recettore per l'IL-2 (*IL-2 Receptor*, IL-2R). In questo modo, sia la citochina sia il recettore raggiungono concentrazioni locali sufficientemente elevate per dare inizio alle risposte cellulari.

L'IL-2 secreta è una glicoproteina globulare di 14-17 kD contenente quattro α eliche (Fig. 9-9). Essa rappresenta il prototipo delle citochine caratterizzate da tale struttura e che interagiscono con i recettori per le citochine di tipo I (vedi Cap. 7).

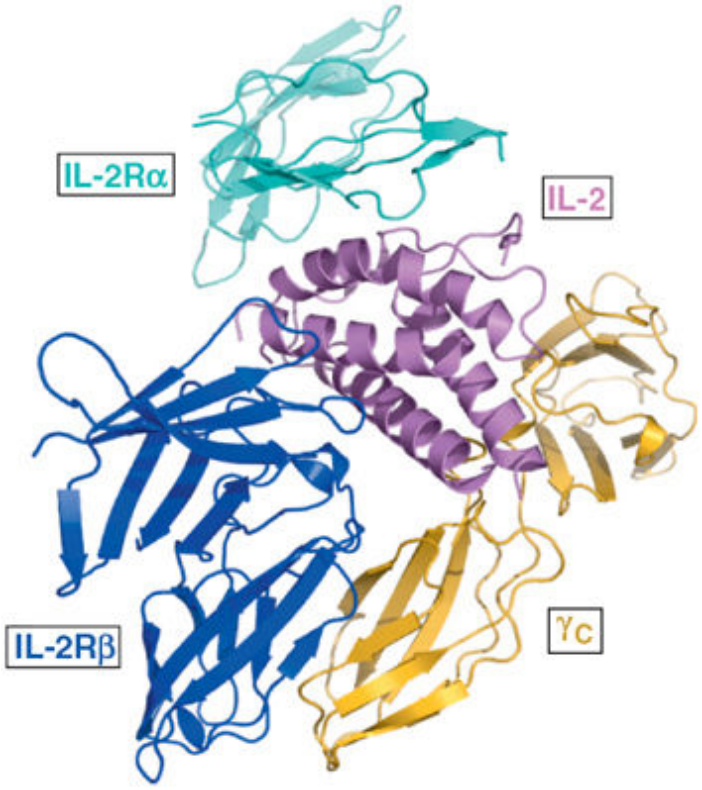


FIGURA 9-9 Struttura dell'IL-2 e del suo recettore. La cristallografia dell'IL-2 e del suo recettore trimerico mostra che la citochina interagisce con tutte e tre le catene recettoriali. (*Riprodotta con l'autorizzazione degli editori da: Wang X, Rickert M e Garcia KC: Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its α, β e γc receptors, Science 310:1159-1163,2005. Per gentile concessione del Dr. Patrick Lupardus e del Dr. K. Christopher Garcia, Stanford University School of Medicine, Palo Alto, California*.)

I linfociti T naïve e quelli effettori esprimono, in seguito all'attivazione e in modo transitorio, recettori per IL-2 (IL-2R); al contrario, i linfociti T regolatori esprimono IL-2R a elevata affinità in modo costitutivo. L'IL-2R

è composto da tre proteine associate in maniera non covalente: IL-2Rα (CD25), IL-2/15Rβ (CD122) e γ_c (CD132). Delle tre proteine, solo la prima è specifica per l'IL-2R. L'IL-2 può legarsi alla sola catena α; in questo caso la interazione è a bassa affinità e non attiva alcuna trasduzione del segnale e nessuna risposta biologica. La catena β di IL2-R si ritrova anche nel recettore per IL-15. Infine, la catena γ è condivisa dai recettori di diverse citochine, tra cui quelli per l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 e l'IL-21 e viene perciò chiamata *catena* γ *comune* (γ_c). Sia le catene β che γ_c trasducono il segnale attraverso la via JAK-STAT (vedi Cap. 7). I linfociti T non attivati (e le cellule NK) esprimono bassi livelli IL2-R formato da complessi IL-2Rβγ_c; questi complessi legano l'IL-2 con una costante di dissociazione (K_d) pari a circa 10^{-9} M (Fig. 9-10). L'espressione di IL-2Rα e, in misura minore, di IL-2Rβ aumenta in seguito all'attivazione dei linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$ naïve. Le cellule che, esprimendo l'IL-2Rα, formano complessi trimerici IL-2Rαβγ_c sono in grado di legare l'IL-2 con una maggiore affinità ($K_d = 10^{-11}$ M) e possono essere stimolate da concentrazioni di IL-2 relativamente basse. L'IL-2, prodotta in risposta alla stimolazione dell'antigene, induce a sua volta l'espressione di IL-2Rα: questo meccanismo di feedback costituisce un sistema di autoamplificazione delle risposte T. I linfociti T $CD4^+$ regolatori (vedi Cap. 15) esprimono il complesso recettoriale trimerico IL-2Rαβγ_c ad alta affinità per IL-2 e sono dunque sempre pronti a rispondere anche a basse concentrazioni di questa citochina. Una stimolazione cronica dei linfociti T determina lo *shedding* (rimozione dalla superficie cellulare) della proteina IL-2Rα, la quale finisce per accumularsi nel siero dove può essere misurata e utilizzata quale marcatore clinico di forte attivazione (per esempio nel rigetto acuto di un trapianto).

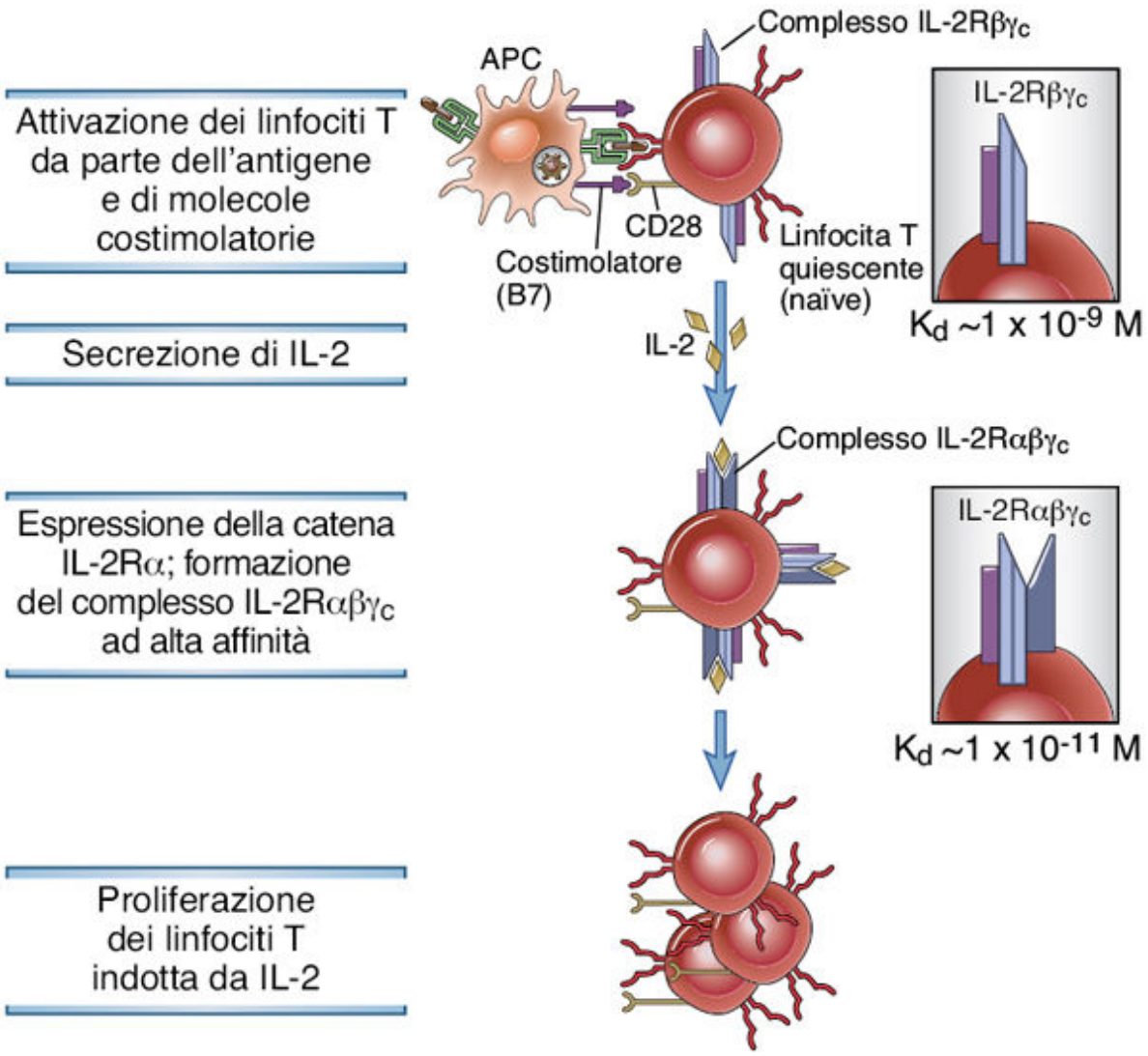


FIGURA 9-10 Regolazione dell'espressione del recettore per l'IL-2. I linfociti T naïve esprimono il complesso recettoriale IL-2R$\beta\gamma_C$, che è caratterizzato da moderata affinità per l'IL-2. L'attivazione da parte dell'antigene in associazione alle molecole costimolatorie e all'IL-2 stessa induce l'espressione della catena α e di elevati livelli del complesso recettoriale trimerico IL-2Rαβγ che, a questo punto, ha alta affinità per la citochina.

Funzioni dell'IL-2

La biologia dell'IL-2 è affascinante, questa citochina infatti gioca diversi ruoli critici sia nella stimolazione che nel controllo delle risposte e delle funzioni dei linfociti T (Fig. 9-11).

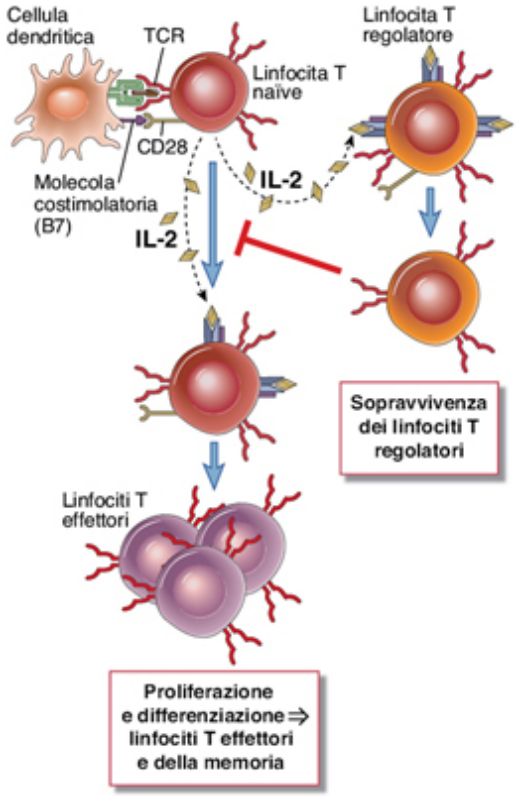


FIGURA 9-11 Attività biologiche dell'IL-2. L'IL-2 stimola la proliferazione e il differenziamento dei linfociti T, comportandosi dunque da fattore di crescita autocrino. Inoltre, stimola i linfociti T regolatori, contribuendo in questo modo alla regolazione delle risposte immunitarie (incluse quelle nei confronti degli antigeni self).

- ***L'IL-2 stimola la sopravvivenza, la proliferazione e il differenziamento dei linfociti T attivati dall'antigene.*** L'IL-2 promuove la sopravvivenza cellulare inducendo la proteina antiapoptotica Bcl-2, stimola la progressione del ciclo cellulare attraverso la sintesi di cicline e annulla l'azione di possibili ostacoli alla progressione del ciclo cellulare attraverso la degradazione dell'inibitore del ciclo cellulare p27. Inoltre, aumenta la produzione di citochine effettrici da parte dei linfociti T (per esempio IFN-γ e IL-4).
- ***L'IL-2 è necessaria per la sopravvivenza e il funzionamento di linfociti T regolatori,*** i quali sopprimono le risposte immunitarie contro gli antigeni self e altri antigeni. A dimostrazione di ciò, si è visto che nei topi geneticamente modificati che mancano di IL-2 o delle catene α o β **dell'IL2-R** si verifica una proliferazione incontrollata dei linfociti T e B e la comparsa di malattie autoimmuni causate dall'assenza dei linfociti T regolatori. Queste osservazioni suggeriscono che, mentre

esistono altri fattori di crescita in grado di sostituire l'IL-2 nell'espansione dei linfociti T effettori, nessun'altra citochina può sostituirla nel ruolo di fattore omeostatico per il funzionamento dei linfociti T regolatori. Discuteremo di questo più dettagliatamente nel Capitolo 15, quando descriveremo le proprietà e le funzioni dei linfociti T regolatori. È interessante notare che, dal momento che i linfociti T regolatori non producono quantità rilevanti di questa citochina, la loro sopravvivenza dipende dalla produzione di IL-2 da parte dei linfociti T attivati dall'antigene.

- ***Infine,* in vitro *è stato dimostrato che l'IL-2 stimola la proliferazione e il differenziamento delle cellule NK e dei linfociti B.*** La rilevanza fisiologica di queste funzioni non è tuttavia ancora definita.

Espansione clonale dei linfociti T

La proliferazione dei linfociti T in seguito al riconoscimento dell'antigene dipende dalla combinazione dei segnali che derivano dal recettore per l'antigene, dalle molecole costimolatorie e dai fattori di crescita autocrini, primo fra tutti l'IL-2. Le cellule che riconoscono l'antigene non solo producono IL-2, ma costituiscono anche il principale bersaglio dell'azione di questa citochina, assicurando così che proliferino principalmente i linfociti T specifici per l'antigene. Questo provoca un aumento del numero delle cellule che appartengono al clone specifico per l'antigene. Tale fenomeno, conosciuto come **espansione clonale**, permette di generare i grandi numeri di cellule necessari all'eliminazione dell'antigene a partire da un piccolo numero iniziale di linfociti naïve specifici per quell'antigene. Prima dell'incontro con l'antigene, la frequenza dei linfociti T naïve specifici per un antigene è di 1 su 10^5-10^6 cellule. In seguito all'incontro con un antigene, la frequenza dei linfociti T $CD8^+$ specifici può aumentare fino a raggiungere l'incredibile numero di 1 su 3 linfociti T CD8+ circolanti: un'espansione del clone iniziale > 50.000 volte, mentre il numero di linfociti $CD4^+$ specifici aumenta sino a 1 su 100 (Fig. 9-12). Studi condotti nel topo hanno mostrato come questa fenomenale espansione della popolazione antigene-specifica osservato nel corso delle infezioni virali acute si realizzi entro una settimana dall'infezione. Altrettanto sorprendente è stata l'osservazione che questa massiva espansione clonale è totalmente antigene specifica, infatti i linfociti

T non specifici per il virus utilizzato sperimentalmente, non proliferano in alcun modo. Nell'uomo, l'espansione dei linfociti T specifici per il virus di Epstein-Barr e per il virus HIV in soggetti con infezione acuta rientra in questo ordine di grandezza.

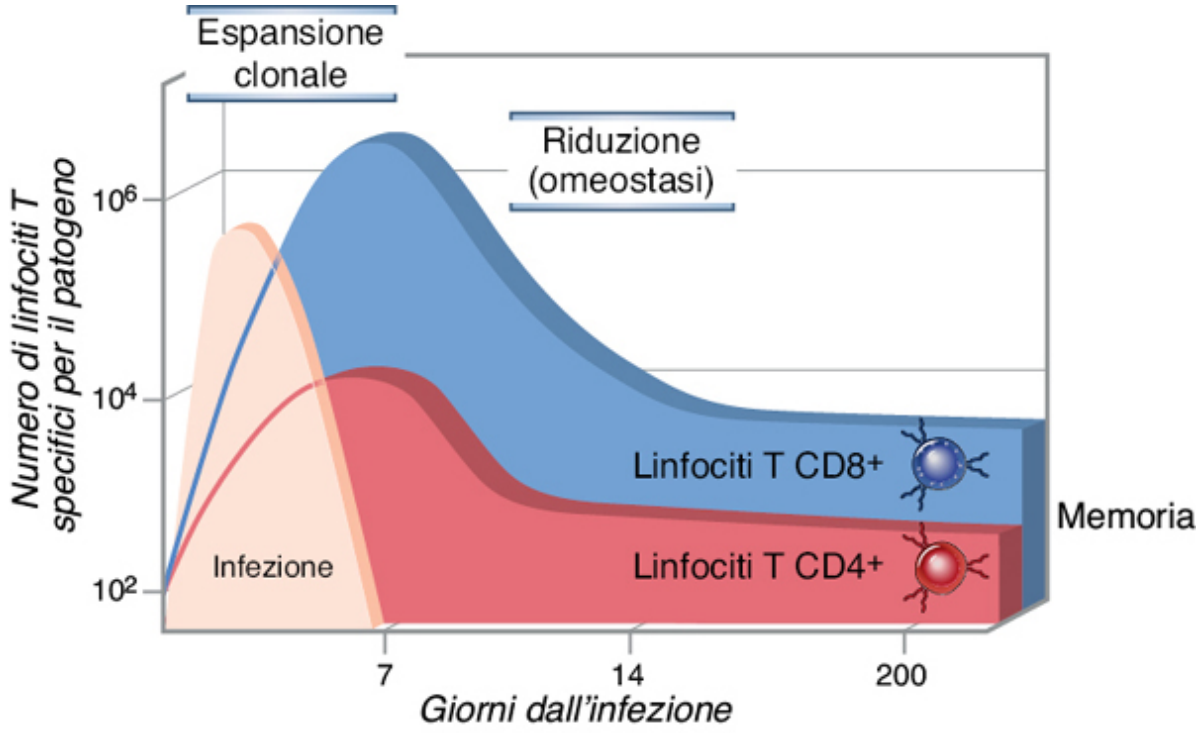


FIGURA 9-12 Espansione clonale dei linfociti T. La figura mostra il numero di linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$ antigene-specifici e schematizza la cinetica della loro espansione e riduzione, nel corso delle risposte immunitarie. I numeri sono approssimazioni basate su studi in modelli sperimentali in topi inbred.

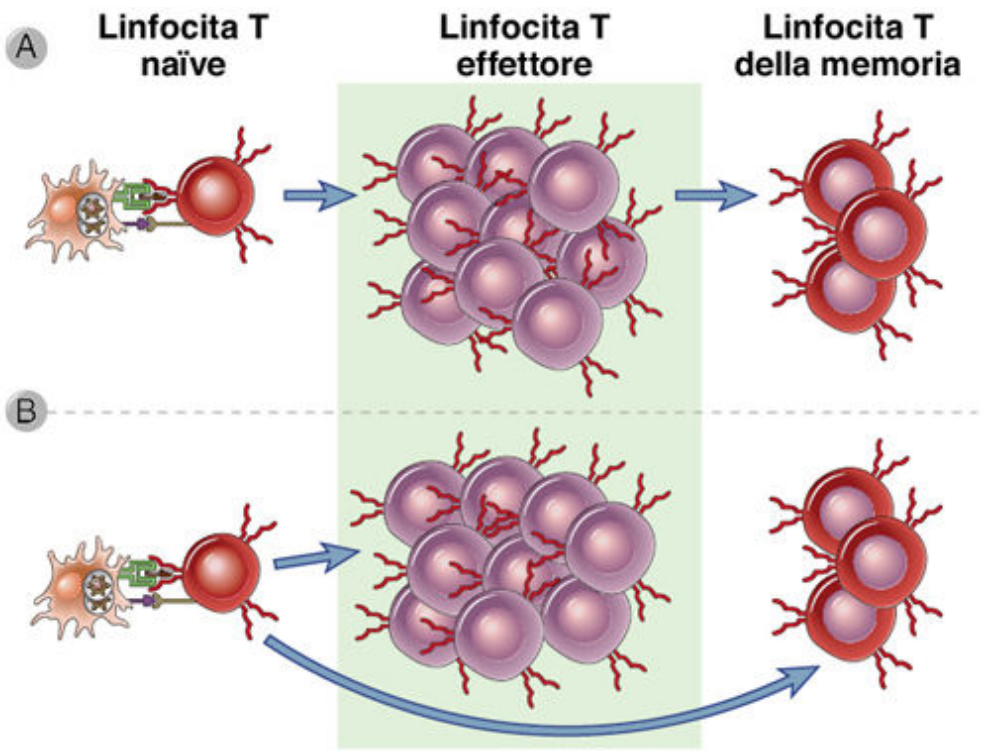


FIGURA 9-13 Sviluppo dei linfociti T della memoria. I linfociti T naïve si differenziano in linfociti effettori e in linfociti della memoria in risposta all'antigene e in presenza di costimolazione. **A.** Modello lineare di differenziamento. Secondo questo modello, la maggior parte delle cellule effettrici muore, mentre le poche che sopravvivono si trasformano in linfociti della memoria. **B.** Modello ramificato di differenziamento. Secondo questo modello, i linfociti effettori e quelli della memoria percorrono una via alternativa a quella dei linfociti T attivati.

Differenziamento dei linfociti T attivati in cellule effettrici

Una parte consistente della progenie dei linfociti stimolati dall'antigene si differenzia in cellule effettrici. Le cellule effettrici $CD4^+$ esplicano il proprio ruolo attraverso l'espressione in membrana di nuove molecole e la secrezione di citochine in grado di attivare altre cellule (linfociti B, macrofagi e cellule dendritiche). L'attivazione dei linfociti T $CD4^+$ naïve determina prevalentemente la secrezione di IL-2, mentre quella dei linfociti effettori comporta la produzione di una grande varietà di citochine caratterizzate da diverse attività biologiche. I linfociti effettori CD8+ sono citotossici e uccidono le cellule infettate. Dal momento che vi sono importanti differenze nelle cellule effettrici $CD4^+$ e $CD8^+$ descriveremo il loro sviluppo e le loro funzioni separatamente nei Capitoli 10 e 11.

Sviluppo dei linfociti T della memoria

Le risposte immunitarie mediate dai linfociti T si associano alla generazione di linfociti T della memoria antigene-specifici, in grado di sopravvivere per molti anni e talvolta per tutta la vita. Le cellule della memoria costituiscono il fulcro dei meccanismi di difesa contro i patogeni che verranno incontrati più di una volta nel corso della vita. Il successo delle vaccinazioni dipende in larga parte dalla generazione di linfociti della memoria. Per esempio, il classico esperimento di Edward Jenner, che vaccinò efficacemente un bambino contro il vaiolo, non è altro che la dimostrazione di una risposta immunitaria mediata da cellule di memoria; tuttavia, nonostante l'importanza della memoria immunologica, molti degli aspetti fondamentali dei meccanismi responsabili dell'instaurazione e della persistenza dei linfociti della memoria devono ancora essere chiariti.

I linfociti della memoria possono originare dalle cellule effettrici, secondo una via di sviluppo lineare, oppure seguire un differenziamento divergente rispetto a quello delle popolazioni effettrici e, in questo caso, le popolazioni effettrici e della memoria rappresentano due vie parallele di attivazione dei linfociti (Fig. 9-13). I meccanismi e i segnali che determinano se un linfocita debba diventare una cellula effettrice di breve durata o un cellula della memoria capace di sopravvivere a lungo rimangono ancora in parte non compresi. Una possibilità è che i fattori di trascrizione attivati durante l'attivazione dei linfociti T influenzino il destino del differenziamento del linfocita T, che ha riconosciuto l'antigene, verso le cellule effettrici o della memoria. Per esempio, l'espressione del fattore di trascrizione T-bet favorisce il differenziamento dei T linfociti $CD4^+$ e $CD8^+$ in cellule effettrici mentre l'espressione di un altro fattore di trascrizione, Blimp-1, spinge le cellule effettrici a differenziarsi in cellule della memoria. Non è tuttora chiaro se l'attivazione di questi fattori di trascrizione sia un processo casuale (stocastico) oppure sia influenzato da segnali esogeni specifici.

Caratteristiche dei linfociti T della memoria

I linfociti della memoria sono caratterizzati dalla capacità di sopravvivere in uno stato quiescente dopo l'eliminazione dell'antigene e dalla capacità di generare risposte secondarie più veloci, ampie ed efficaci rispetto a

quelle generate dai linfociti naïve. Molte caratteristiche delle cellule della memoria sono alla base di queste proprietà.

- ***Le cellule della memoria esprimono livelli aumentati di proteine anti-apoptotiche, che possono essere responsabili della loro prolungata sopravvivenza.*** I linfociti T naïve sopravvivono per settimane o mesi e sono poi rimpiazzati da altre cellule naïve che si sviluppano nel timo, mentre i linfociti della memoria possono sopravvivere per mesi o anni. Perciò, poiché gli esseri umani invecchiano in un ambiente nel quale vengono costantemente esposti ad agenti infettivi, la proporzione delle cellule della memoria aumenta progressivamente rispetto a quella delle cellule naïve. Si calcola che, in soggetti con più di 50 anni di età, la metà o più dei linfociti T circolanti possano essere cellule della memoria. Proteine anti-apoptotiche, quali Bcl-2 e Bcl-X_L, promuovono la sopravvivenza cellulare impedendo il rilascio del citocromo c dai mitocondri e bloccano l'apoptosi indotta dal deficit di segnali di sopravvivenza (vedi Fig. 15-7). La presenza di queste proteine consente alle cellule della memoria di sopravvivere anche al termine della risposta immunologica che ha eliminato l'antigene, cioè quando sono terminati i segnali fisiologici che permettono la sopravvivenza e la proliferazione dei linfociti T in seguito al riconoscimento dell'antigene.
- ***Le cellule della memoria rispondono più rapidamente alla stimolazione da parte dell'antigene rispetto a quanto facciano le cellule naïve specifiche per lo stesso antigene.*** La rapidità con cui i linfociti della memoria rispondono all'antigene è stata documentata da molti studi, sia nell'uomo sia in animali da esperimento. Nel topo, per esempio, i linfociti T naïve rispondono all'antigene in 5-7 giorni, mentre per attivare i linfociti della memoria sono sufficienti 1-3 giorni (vedi Fig. 1-4). Una possibile spiegazione per questo fenomeno è che nelle cellule della memoria i loci genici per le citochine e le altre molecole effettrici siano in uno stato di accessibilità probabilmente a causa di cambiamenti nel grado di metilazione e acetilazione degli istoni. Di conseguenza, questi geni possono rispondere rapidamente alla stimolazione da parte dell'antigene.
- ***Il numero di linfociti T della memoria specifici per un determinato antigene è maggiore rispetto al numero di cellule naïve specifiche per***

lo stesso antigene. Come detto precedentemente, la proliferazione conduce a un'importante espansione clonale e al differenziamento dei linfociti naïve in linfociti effettori, la maggior parte dei quali muore quando l'antigene viene eliminato. Le cellule che sopravvivono sono quelle della memoria e tipicamente sono 10-100 volte più numerose rispetto al numero dei linfociti naïve esistenti prima dell'incontro con l'antigene. L'aumento del numero dei linfociti appartenenti a un determinato clone costituisce la principale ragione per cui la stimolazione con un antigene di un individuo precedentemente immunizzato evoca una risposta più robusta rispetto a quella della prima immunizzazione. Come prevedibile, la numerosità del pool di cellule della memoria è proporzionale alla numerosità delle cellule naïve specifiche per quell'antigene.

- ***Le cellule della memoria sono in grado di migrare e rispondere agli antigeni nei tessuti periferici.*** Come abbiamo precedentemente discusso, i linfociti T naïve migrano preferibilmente verso gli organi linfoidi secondari, ma le cellule della memoria possono migrare verso qualsiasi tessuto. Questa differenza è dovuta a differenze nell'espressione di molecole di adesione e di recettori per le chemochine. Inoltre, i linfociti T della memoria sono meno dipendenti dalla costimolazione rispetto alle cellule naïve; ciò consente alle cellule della memoria presenti nei tessuti periferici, di rispondere agli antigeni presentati da tipi diversi di APC; al contrario, come abbiamo già visto precedentemente in questo capitolo e nel Capitolo 6, i linfociti T naïve sono attivati solo in seguito alla presentazione dell'antigene da parte di cellule dendritiche mature a livello degli organi linfoidi.
- ***I linfociti della memoria sono in una condizione di continua e lenta proliferazione; questa capacità di autorinnovarsi può contribuire alla loro lunga sopravvivenza.*** Tale proliferazione potrebbe essere regolata da citochine. Grazie alla capacità di autorinnovarsi, i linfociti della memoria sono stati paragonati alle cellule staminali.
- ***La sopravvivenza dei linfociti della memoria dipende dall'azione di citochine ma non richiede il riconoscimento dell'antigene.*** La citochina più importante è l'IL-7 (ricordiamo che tale citochina gioca un ruolo fondamentale anche nelle fasi precoci dello sviluppo linfocitario, vedi Cap. 8, e nella sopravvivenza dei linfociti T naïve,

vedi Cap. 2). Non è dunque sorprendente vedere che i linfociti T della memoria esprimono elevati livelli del recettore di IL-7 (CD127). La sopravvivenza dei linfociti T $CD8^+$ della memoria dipende anche dall'IL-15, una citochina correlata all'IL-7. L'IL-7 e l'IL-15 inducono l'espressione di proteine anti-apoptotiche e stimolano la proliferazione sopra descritta. La capacità delle cellule della memoria di sopravvivere indipendentemente dal riconoscimento di un antigene è stata dimostrata mediante esperimenti in topi geneticamente modificati nei quali i linfociti maturi perdono l'espressione del recettore per l'antigene. In questi topi, l'eliminazione del recettore per l'antigene provoca la rapida riduzione dei linfociti naïve, ma non influenza la sopravvivenza dei linfociti della memoria.

I marcatori di superficie più affidabili per l'identificazione dei linfociti T della memoria sono il recettore per l'IL-7 e una proteina dalla funzione sconosciuta chiamata CD27, oltre che l'assenza di marcatori specifici dei linfociti T naïve o di attivazione (vedi Tab. 2-3). Nell'uomo, la maggior parte dei linfociti T naïve esprime l'isoforma 200-kD di una proteina di membrana chiamata CD45RA (per "ristretta A") mentre la maggior parte dei linfociti T della memoria esprime un'isoforma di CD45 di 180-kD chiamata CD45RO (vedi Cap. 2).

I linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$ della memoria sono eterogenei e possono essere suddivisi in sottopopolazioni a seconda delle loro funzioni e della loro capacità di raggiungere tessuti diversi. I linfociti T della **memoria centrale** esprimono il recettore per le chemochine CCR7 e la L-selectina, grazie ai quali si localizzano preferenzialmente a livello linfonodale. Essi possiedono limitate capacità effettrici ma proliferano attivamente in seguito alla stimolazione da parte dell'antigene, dando origine a un elevato numero di linfociti effettori. I linfociti T della **memoria effettrice**, d'altro canto, non esprimono né CCR7 né L-selectina e si localizzano nei tessuti periferici, specialmente in quelli mucosi. L'attivazione da parte dell'antigene provoca il rilascio di citochine effettrici, come l'IFN-γ o, in alternativa, la rapida assunzione di un profilo citotossico in assenza di una spiccata proliferazione. La ridotta proliferazione di questa sottopolazione effettrice spiega come essa, pur essendo capace di rispondere rapidamente ad un contatto con un patogeno, possa non essere sufficiente per la completa eradicazione

dell'infezione in assenza della proliferazione dei linfociti T della memoria centrale, che porta alla rapida generazione di una grande quantità di cellule effettrici. Non sappiamo ancora se tutti i linfociti T della memoria possano essere classificati in linfociti della memoria centrale ed effettrice.

I linfociti della memoria sono eterogenei anche dal punto di vista del profilo di citochine che producono. Per esempio, i linfociti T della memoria $CD4^+$ possono derivare da precursori non indirizzati in senso T_H1, T_H2 o T_H17 (descritti nel Capitolo 10) e, quando vengono attivati dalla riesposizione all'antigene e dalle citochine, possono differenziarsi in una qualsiasi di queste sottopopolazioni. Altre cellule possono invece derivare da effettori completamente differenziati e conservare i rispettivi profili citochinici. Possono inoltre esistere linfociti della memoria $CD8^+$ che hanno alcune delle caratteristiche fenotipiche dei CTL differenziati.

RISOLUZIONE DELLE RISPOSTE T

L'eliminazione dell'antigene conduce al declino della risposta T; ciò è fondamentale per permettere il mantenimento dell'omeostasi nel sistema immunitario. Questo fenomeno è dovuto a diverse ragioni che possono essere riassunte dalla constatazione che, quando l'antigene viene eliminato e la risposta innata termina, vengono a mancare i segnali che normalmente mantengono i linfociti vivi e proliferanti. Ricordiamo che la costimolazione e i fattori di crescita (come per esempio l'IL-2) stimolano l'espressione delle proteine anti-apoptotiche Bcl-2 e Bcl-X_L, fondamentali per la sopravvivenza dei linfociti attivati. Non appena il livello della costimolazione e la concentrazione di IL-2 calano, diminuisce anche l'espressione delle proteine anti-apoptotiche. Contemporaneamente la cessata produzione dei fattori di crescita attiva sensori di stress cellulare (come la proteina Bim), i quali stimolano l'apoptosi mitocondriale che non è più contrastata dalle proteine anti-apoptotiche (vedi Fig. 15-8). Ne consegue che la maggior parte delle cellule prodotte durante l'attivazione muore, mentre l'attivazione di nuove cellule diminuisce causando la contrazione del numero di linfociti specifici.

La possibilità che esistano meccanismi che regolano la cessazione fisiologica della risposta immunitaria è stata oggetto di molti studi. I

meccanismi proposti comprendono i recettori inibitori CTLA-4 e PD-1, i linfociti T regolatori, e l'apoptosi innescata dai recettori di morte appartenenti alla superfamiglia del recettore per il TNF (come per esempio TNFRI e Fas).

RIEPILOGO

* Le risposte dei linfociti T sono innescate sia da segnali generati dal riconoscimento, da parte del TCR, del complesso peptide-MHC presente sulla superficie di una APC, sia da segnali forniti da molecole costimolatorie, anch'esse espresse dalle APC.
* Le molecole costimolatorie meglio conosciute appartengono alla famiglia B7 e vengono riconosciute da recettori della famiglia di CD28, espressi dai linfociti T. L'incontro con i patogeni aumenta l'espressione di molecole costimolatorie B7: questo meccanismo consente di ottimizzare le risposte contro tali patogeni. Alcuni membri della famiglia CD28 inibiscono, anziché stimolare, le risposte dei linfociti T. Quindi, il risultato del riconoscimento dell'antigene in termini di attivazione linfocitaria dipende dall'equilibrio tra i recettori attivatori e quelli inibitori che compongono la famiglia CD28.
* La risposta all'antigene e alle molecole costimolatorie comporta cambiamenti nell'espressione di alcune molecole di membrana e stimola la sintesi delle citochine e dei recettori per le citochine, la proliferazione cellulare e il differenziamento in cellule effettrici e della memoria.
* Le molecole di membrana indotte dall'attivazione includono i recettori per le citochine, le molecole effettrici e regolatorie, le proteine coinvolte nella ritenzione dei linfociti T negli organi linfoidi e le molecole che influenzano la migrazione di tali cellule.
* In seguito all'attivazione, i linfociti T producono l'IL-2 ed esprimono alti livelli del suo recettore specifico. L'IL-2 determina la proliferazione cellulare che, di norma, risulta in una marcata espansione dei cloni antigene-specifici.
* Alcuni linfociti attivati possono differenziarsi in cellule della memoria: queste sopravvivono per lunghi periodi e sono in grado di rispondere rapidamente a una successiva stimolazione da parte dell'antigene. La sopravvivenza delle cellule della memoria dipende da citochine come l'IL-7, che promuovono l'espressione di proteine anti-apoptotiche e mantengono queste cellule in un blando e continuo stato proliferativo. I linfociti della memoria includono diverse sottopopolazioni che differiscono per le loro proprietà migratorie e funzionali.
* In seguito all'eliminazione dell'antigene, le risposte dei linfociti T diminuiscono fino a cessare; ciò si verifica soprattutto perché i segnali che comportano l'attivazione dei linfociti sono esauriti.

LETTURE CONSIGLIATE

Attivazione e proliferazione dei linfociti T

Huppa J.B.; Davis M.M: The interdisciplinary science of T-cell recognition. *Advances in Immunology* 119 1–50 (2013).

Jenkins M.K.; Moon J.J: The role of naïve T cell precursor frequency and recruitment in dictating immune response magnitude. *Journal of Immunology* 188 4135–4140 (2012).

Costimolazione: B7, CD28 e altro

Chen L.; Flies D.B: Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology* 13 227-242 (2013).

Croft M: The TNF family in T cell differentiation and function–unanswered questions and future directions. *Seminars in Immunology* (2014, Mar 5,). (epub).

Greenwald R.J.; Freeman G.J.; Sharpe A.H: The B7 family revisited. *Annual Review of Immunology* 23 515-548 (2005).

Citochine

Boyman O.; Sprent J: The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Reviews Immunology* 12 180-190 (2012).

Huse M.; Quann E.J.; Davis M.M: Shouts, whispers and the kiss of death: directional secretion in T cells. *Nature Immunology* 9 1105-1111 (2008).

Liao W.; Lin J.X.; Leonard W.J: Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity* 38 13-25 (2013).

Rochman Y.; Spolski R.; Leonard W.J: New insights into the regulation of T cells by γ_C family cytokines. *Nature Reviews Immunology* 9 169-173 (2009).

Linfociti T della memoria

Mueller S.N.; Gebhardt T.; Carbone F.R.; Heath W.R: Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annual Review of Immunology* 31 137–161 (2013).

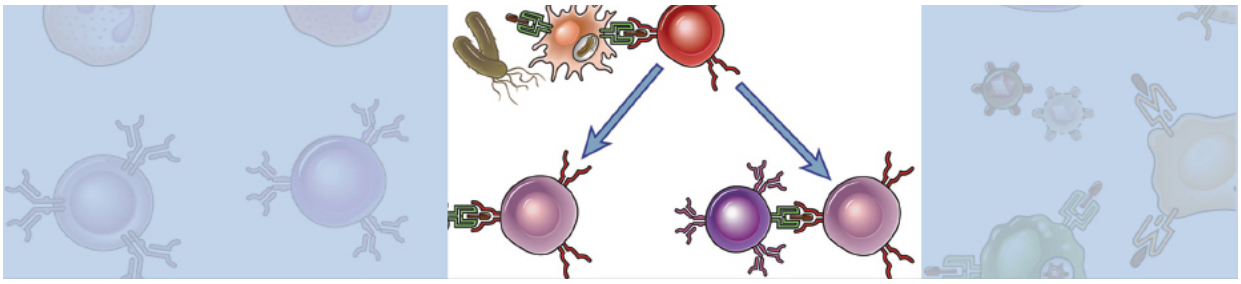
Pepper M.; Jenkins M.K: Origin of $CD4^+$ effector and central memory T cells. *Nature Immunology* 12 467-471 (2011).

Sallusto F.; Lanzavecchia A: Heterogeneity of $CD4^+$ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *European Journal of Immunology* 39 2076-2082 (2009).

Sprent J.; Surh C.D: Normal T cell homeostasis: the conversion of naïve cells into memory-phenotype cells. *Nature Immunology* 12 478-484 (2011).

CAPITOLO

10



Differenziazione e funzioni dei linfociti T $CD4^+$ effettori

CARATTERISTICHE GENERALI DELL'IMMUNITÀ CELLULO-MEDIATA

SOTTOPOPOLAZIONI DI LINFOCITI T $CD4^+$ EFFETTORI

- Proprietà dei linfociti T_H1, T_H2 e T_H17
- Sviluppo dei linfociti T_H1, T_H2 e T_H17

LINFOCITI T_H1

- Sviluppo dei linfociti T_H1
- Funzioni dei linfociti T_H1

LINFOCITI T_H2

- Sviluppo dei linfociti T_H2
- Funzioni dei linfociti T_H2

LINFOCITI T_H17

- Sviluppo dei linfociti T_H17
- Funzioni dei linfociti T_H17

FUNZIONI DI ALTRE CLASSI DI LINFOCITI T

- Linfociti T γδ
- Cellule NKT

RIEPILOGO

Le funzioni dei linfociti T $CD4^+$ effettori sono il reclutamento e l'attivazione delle cellule fagocitiche (macrofagi e neutrofili) e di altre cellule in grado di eliminare i microbi intracellulari, e alcuni extracellulari, e il supporto ai linfociti B per la produzione degli anticorpi. I linfociti T $CD4^+$ svolgono una funzione essenziale per l'eliminazione dei microbi da parte dei fagociti, mentre i linfociti T $CD8^+$ effettori sono responsabili per l'eradicazione dei microbi, in genere virus, che infettano e si replicano all'interno di tutte le cellule, incluse quelle non fagocitiche (Fig. 10-1). Per ragioni storiche, il termine **immunità cellulo-mediata** si riferisce al processo di eliminazione dei microbi da parte dei fagociti stimolati dai linfociti T $CD4^+$. Alcuni linfociti T $CD4^+$ attivano anche altre cellule, quali gli eosinofili, per

combattere particolari tipi di microbi. Sebbene queste reazioni non siano incluse nella definizione originale di immunità cellulo-mediata, si tratta di funzioni importanti dei linfociti T effettori. In questo capitolo descriveremo il ruolo dei linfociti T $CD4^+$ nell'eliminazione dei microbi. Nella parte conclusiva, parleremo di alcune classi minoritarie di linfociti T che assolvono alle loro funzioni attraverso la produzione di citochine. La differenziazione e le funzioni dei linfociti $CD8^+$ effettori sono discusse nel Capitolo 11, mentre il ruolo dei linfociti T helper nelle risposte anticorporali è trattato nel Capitolo 12.

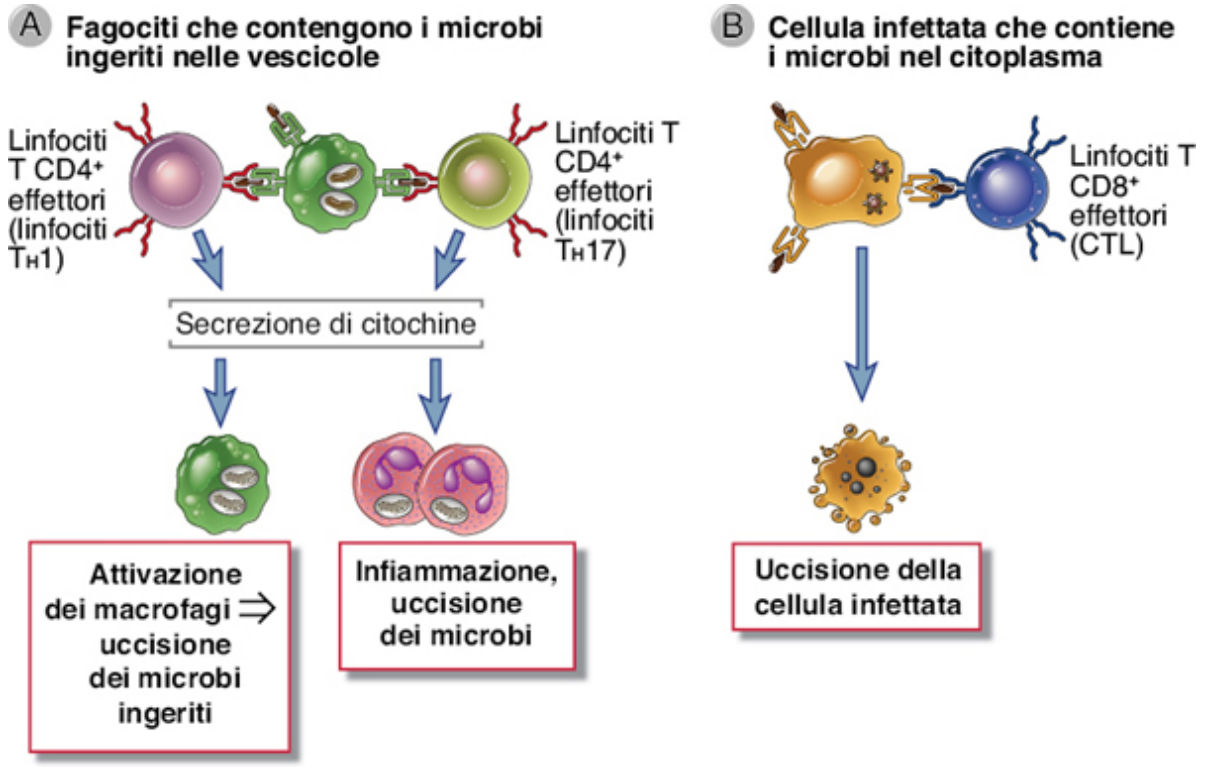


FIGURA 10-1 Ruolo dei linfociti T nell'eradicazione delle infezioni. A. I linfociti T $CD4^+$ riconoscono gli antigeni dei microrganismi extracellulari o fagocitati e producono citochine che stimolano l'attività microbicida e proinfiammatoria dei fagociti. Anche i linfociti $CD8^+$ possono contribuire a questi processi secernendo citochine. **B.** I CTL $CD8^+$ riconoscono gli antigeni dei microbi che risiedono nel citosol provocando la morte delle cellule infettate.

CARATTERISTICHE GENERALI DELL'IMMUNITÀ CELLULO-MEDIATA

L'immunità cellulo-mediata è la risposta immunitaria dell'ospite mediata dai linfociti T e costituisce un meccanismo di difesa contro i microbi intracellulari e fagocitati. Storicamente, gli immunologi hanno suddiviso l'immunità acquisita in immunità umorale, che può essere trasferita da un donatore immunizzato a un ospite naïve per mezzo della sola somministrazione di anticorpi in assenza di cellule, e immunità cellulo-mediata, che può essere invece trasferita mediante i linfociti T. La fase effettrice dell'immunità umorale è innescata dal riconoscimento dell'antigene da parte degli anticorpi secreti; quindi, l'immunità umorale è efficace contro microrganismi e tossine extracellulari che sono accessibili agli anticorpi ma non contro i microrganismi che sopravvivono e si moltiplicano all'interno delle cellule. Al contrario, nell'immunità cellulo-mediata, la fase effettrice viene attivata dal riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti T. Questi però sono in grado di riconoscere solo gli antigeni microbici di natura proteica presentati sulla superficie delle cellule infettate, quali i peptidi processati e associati alle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (*Major Histocompatibility Complex*, MHC). Quindi, l'immunità cellulo-mediata è efficace sia contro i microrganismi fagocitati sia contro quelli intracellulari. Difetti nell'immunità cellulo-mediata producono un aumento della suscettibilità alle infezioni da parte di virus e batteri intracellulari così come da parte di batteri extracellulari e funghi normalmente eliminati dai fagociti. Le reazioni immunitarie mediate dai linfociti T sono importanti anche nel rigetto del trapianto eterologo (vedi Cap. 17), nell'immunità contro i tumori (vedi Cap. 18) e nelle malattie infiammatorie su base immunitaria (vedi Cap. 19).

La sequenza di eventi nelle risposte dei linfociti T $CD4^+$ comprende: a) l'attivazione iniziale negli organi linfoidi per la generazione dei linfociti effettori e della memoria, b) la migrazione dei linfociti effettori ai siti di infezioni e c) l'eliminazione dei patogeni nei siti periferici (Fig. 10-2).

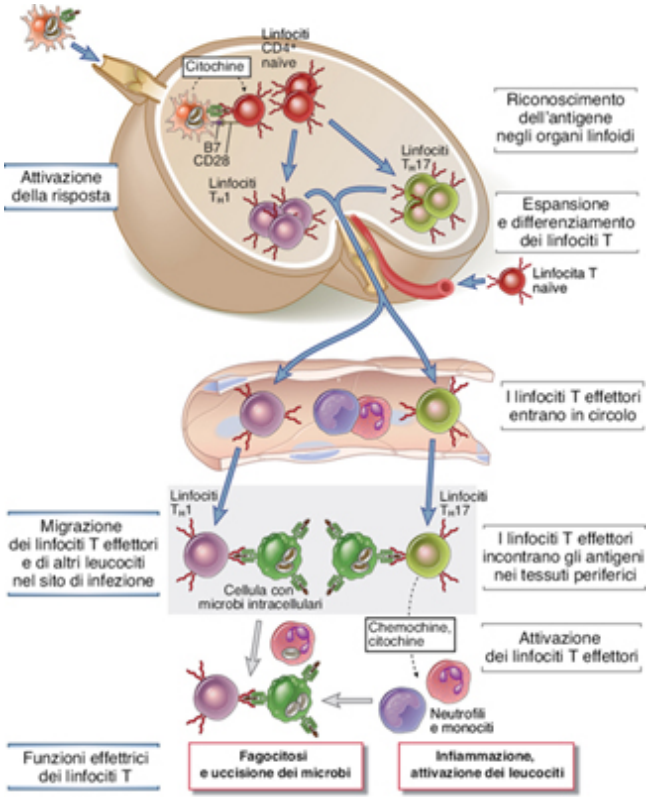


FIGURA 10-2 Risposte dei linfociti T CD4$^+$ nell'immunità cellulo-mediata. Induzione della risposta: negli organi linfoidi secondari i linfociti T CD4$^+$ riconoscono i peptidi derivati dagli antigeni proteici, presentati dalle cellule dendritiche. I linfociti T sono quindi stimolati a proliferare e a differenziarsi in cellule effettrici o della memoria che poi entreranno in circolo. Migrazione dei linfociti T effettori e di altri leucociti verso il focolaio d'infezione: i linfociti T effettori e altri leucociti migrano dai vasi sanguigni ai tessuti periferici aderendo alle cellule endoteliali che sono state attivate da citochine prodotte nei tessuti sede di infezioni. Funzioni effettrici dei linfociti T: i linfociti T effettori riconoscono l'antigene nei tessuti infettati secernendo citochine che reclutano altri leucociti e stimolano i fagociti a eradicare l'infezione

L'attivazione iniziale dei linfociti T è riportata nel Capitolo 9, mentre le frasi successive, relative alla genesi e alle funzioni dei linfociti T CD4$^+$ effettori, sono descritte in questo capitolo.

I linfociti T CD4$^+$ effettori si generano negli organi linfoidi secondari in seguito al riconoscimento degli antigeni, ma la maggior parte di essi lascia questi organi e migra ai focolai periferici di infezione per eliminare i microbi. Tale migrazione dipende dalle molecole di adesione presenti sull'endotelio e dalle chemochine prodotte nei tessuti (vedi Cap. 3). Sebbene la migrazione sia ampiamente indipendente dall'antigene, i linfociti T che riconoscono l'antigene nei tessuti extravascolari sono di preferenza trattenuti

qui. Una volta raggiunti i tessuti periferici, i linfociti T incontrano gli antigeni microbici presentati dai macrofagi e da altre cellule che presentano l'antigene (*Antigen-Presenting Cells,* APC). I linfociti T che riconoscono in maniera specifica gli antigeni ricevono segnali attraverso i propri recettori per l'antigene (TCR) che aumentano l'affinità delle integrine per i propri ligandi. Due di queste integrine, VLA-4 e VLA-5, legano la fibronectina nella matrice extracellulare, e una terza molecola di adesione, CD44, anch'essa fortemente espressa dai linfociti T attivati, si lega all'acido ialuronico. Di conseguenza, i linfociti effettori e della memoria che incontrano l'antigene sono selettivamente trattenuti nei siti extravascolari. I linfociti T che migrano in un sito di infiammazione ma che non possiedono la specificità per l'antigene coinvolto, possono morire nel tessuto o ritornare in circolo attraverso i vasi linfatici.

Alcuni linfociti T $CD4^+$ che si sono attivati negli organi linfoidi secondari migrano nei follicoli senza uscire dall'organo linfoide; qui espletano un'azione di supporto per la produzione di anticorpi ad alta affinità di svariati isotipi da parte dei linfociti B. Questi linfociti T helper sono chiamati linfociti T helper follicolari; le funzioni di questi linfociti nelle risposte immunitarie umorali sono descritte nel Capitolo 12.

Nelle risposte immuntarie cellulo-mediate nei confronti di microbi fagocitati, i linfociti T riconoscono in maniera specifica gli antigeni ma sono i fagociti i responsabili dell'uccisione dei patogeni.

Quindi, i linfociti T effettori $CD4^+$ fanno da tramite tra lo specifico riconoscimento dei microrganismi e l'attivazione di altri tipi di leucociti preposti all'eliminazione del microrganismo. Questo concetto fondamentale è stato evidenziato per la prima volta grazie agli studi sull'immunità cellulo-mediata rivolti verso il batterio intracellulare *Listeria monocytogenes* (Fig. 10-3). Negli anni ′50, è stato dimostrato che topi precedentemente infettati con una piccola dose di *Listeria* erano protetti da somministrazioni successive di dosi più elevate dello stesso batterio, che risultavano letali per animali precedentemente non infettati. La protezione poteva essere trasferita ad altri animali non precedentemente infettati tramite i linfociti (che in seguito si scoprirono essere linfociti T), ma non tramite il siero, la frazione fluida del sangue coagulato che contiene gli anticorpi, provenienti dai topi infettati. *In vitro*, i batteri non erano eliminati dai linfociti T degli animali

immuni ma dai macrofagi attivati, sottolineando il ruolo dei macrofagi nell'esecuzione della funzione di effettore.

FIGURA 10-3 Risposta cellulo-mediata nei confronti di *Listeria monocytogenes*. La risposta immunitaria verso *L. monocytogenes* è misurata valutando l'inibizione della crescita batterica in cellule spleniche espiantate da animali inoculati con una dose nota di batteri vitali. Tale immunità può essere trasferita a un topo non vaccinato attraverso il trasferimento di linfociti T (**A**), ma non di siero (**B**) proveniente da topi singenici precedentemente immunizzati con basse dosi di *L. monocytogenes* inattivata. In un saggio *in vitro* di immunità cellulo-mediata (**C**), i batteri vengono efficientemente uccisi dai macrofagi attivati ma non dai linfociti T.

La fagocitosi e l'eliminazione dei microbi da parte dei fagociti è una reazione importante dell'immunità innata, ma i linfociti T sono in grado di aumentare significativamente questa funzione dei fagociti. Come abbiamo visto nel Capitolo 4, i fagociti riconoscono i microbi, sono attivati dai ligandi microbici, e sono molto efficaci nell'eliminazione di vari tipi di microbi. Tuttavia, numerosi patogeni infettivi si sono evoluti per resistere a questo meccanismo dell'immunità innata e sono in grado di sopravvivere e addirittura di replicare all'interno dei macrofagi. In queste situazioni, i linfociti T che riconoscono gli antigeni microbici arruolano e attivano i fagociti, facendo sì che questi eradichino le infezioni che non possono essere

combattute dalla sola immunità innata. I linfociti T $CD4^+$ effettori attivano i fagociti attraverso molecole espresse sulla superficie cellulare, principalmente il ligando del CD40 (CD40L), e le citochine secrete. Vedremo come questi segnali cooperano quando discuteremo dell'attivazione dei macrofagi, nel proseguo del capitolo, e dei linfociti B nel Capitolo 12.

L'infiammazione, intesa come reclutamento e attivazione dei leucociti, si accompagna frequentemente alle risposte dei linfociti T $CD4^+$ e in molti casi può danneggiare i tessuti normali. In questo caso si parla di **ipersensibilità di tipo ritardato** (*Delayed-Type Hypersensitivity*, DTH), intendendo con il termine *ipersensibilità* il danno tissutale provocato da una risposta immunitaria. La risposta DTH si associa frequentemente a risposte cellulari protettive e paradossalmente può rappresentare la causa delle manifestazioni patologiche di alcuni tipi di infezioni (vedi Capp. 16 e 19).

Dal momento che le funzioni dei linfociti T $CD4^+$ sono mediate in larga parte dalle citochine, grandi sforzi sono stati diretti alla loro definizione, all'identificazione di quali cellule le producono, e al loro funzionamento. Una delle scoperte più importati nel campo dell'immunologia è stata l'identificazione delle popolazioni di linfociti T $CD4^+$ effettori che possono essere distinte sulla base delle citochine che producono e dei fattori di trascrizione che esprimono. Iniziamo descrivendo le proprietà principali di queste classi di linfociti, per poi passare alla descrizione dello sviluppo e delle funzioni di ciascuna di esse.

SOTTOPOPOLAZIONI DEI LINFOCITI T $CD4^+$ EFFETTORI

Esistono tre diverse sottopopolazioni di linfociti T $CD4^+$, i T_H1, T_H2 e T_H17, le quali combattono patogeni diversi e possono essere coinvolte nell'insorgenza di diversi tipi di danno tissutale e malattie immunitarie (Fig. 10-4). Una quarta sottopopolazione è rappresentata dai linfociti T helper follicolari, importanti nella risposta anticorpale, descritti nel Capitolo 12. I linfociti T regolatori rappresentano un'ulteriore popolazione di linfociti

T CD4$^+$. Questi linfociti non sono effettori, bensì, hanno il ruolo di controllare e regolare l'evoluzione delle risposte contro antigeni sia self sia estranei; queste cellule saranno descritte nel Capitolo 15, nel contesto della tolleranza immunologica.

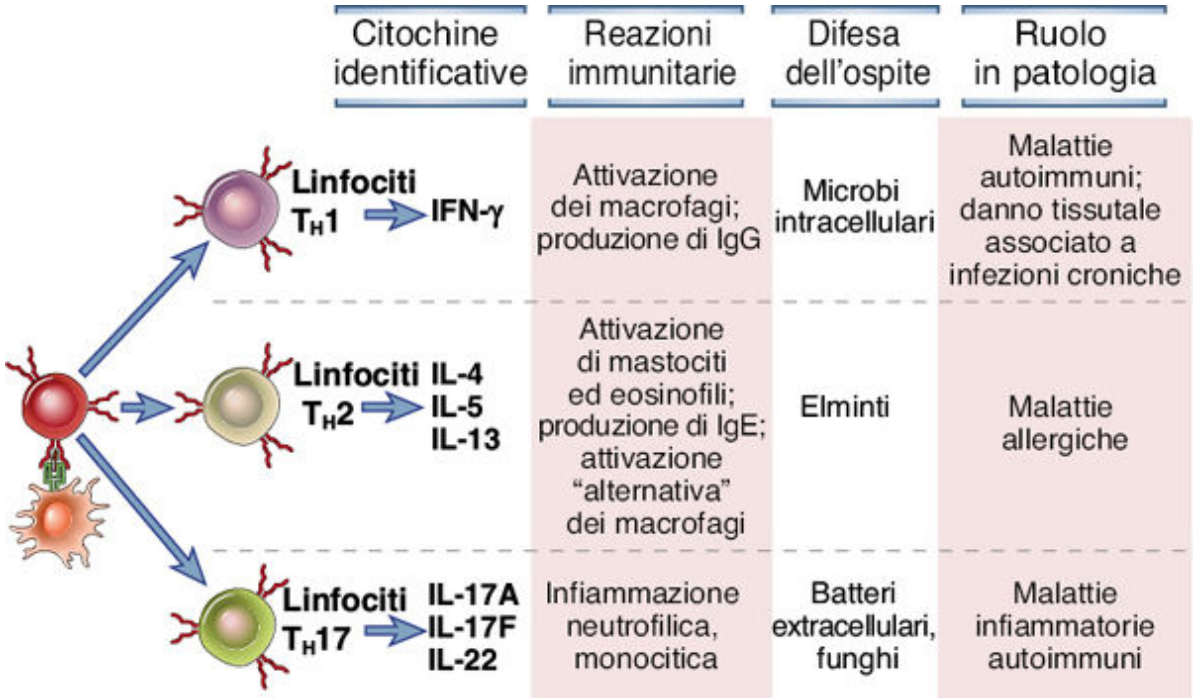


FIGURA 10-4 Caratteristiche dei linfociti T_H1, T_H2 e T_H17 CD4$^+$ helper. I linfociti T CD4$^+$ naïve possono differenziarsi in distinte sottopopolazioni di cellule effettrici in seguito all'interazione con l'antigene, con le molecole costimolatorie e con le citochine. Nelle colonne sulla destra sono riportate le principali differenze tra le sottopopolazioni.

Proprietà dei linfociti T_H1, T_H2, e T_H17

Da molti anni si sapeva che le risposte immunitarie coinvolte nei diversi tipi di infezioni possono assumere connotati profondamente differenti, così come può essere diverso il contributo del sistema immunitario nell'ambito delle diverse patologie. Per esempio, le risposte contro i batteri intracellulari come *Mycobacterium tuberculosis* sono dominate da macrofagi attivati, mentre le reazioni ai parassiti elmintici consistono nella produzione di IgE e nell'attivazione degli eosinofili. Analogamente, in molte patologie autoimmuni croniche il danno tissutale è causato dall'infiammazione, caratterizzata dall'accumulo di neutrofili, macrofagi e linfociti T, mentre nelle malattie allergiche le lesioni tissutali contengono molti eosinofili, oltre

ad altri leucociti. Nel momento in cui fu evidente che tutte queste risposte fenotipicamente diverse dipendevano dai linfociti T $CD4^+$, emerse la domanda: come può un unico tipo cellulare stimolare risposte così diverse? Oggi sappiamo che la risposta a questa domanda sta nel fatto che le diverse sottopopolazioni T $CD4^+$ effettrici, producendo spettri di citochine distinti, stimolano reazioni diverse e sono responsabili della difesa contro microbi diversi, oltre a essere coinvolte nella patogenesi di distinte malattie immunomediate. Le prime sottopopolazioni identificate furono coerentemente chiamate cellule T helper di tipo 1 e di tipo 2, oggi note come T_H1 e T_H2. I linfociti T_H17, così chiamati per la loro peculiare capacità di produrre IL-17, sono stati scoperti molti anni dopo l'identificazione dei linfociti T_H1 e T_H2. La scoperta che alcune malattie infiammatorie, fino a quel momento considerate mediate dai linfociti T_H1 erano in realtà indipendenti da questa sottopopolazione condusse all'identificazione dei linfociti T_H17.

Le caratteristiche distintive delle diverse sottopopolazioni sono rappresentate dalle citochine prodotte, dai fattori trascrizionali espressi e dai cambiamenti epigenetici che si osservano in corrispondenza dei geni per le varie citochine. Queste caratteristiche verranno di seguito descritte per ciascuna sottopopolazione.

Le citochine distintive delle maggiori sottopopolazioni dei linfociti T $CD4^+$ sono: l'IFN-γ per i linfociti T_H1; l'IL-4, l'IL-5 e l'IL-13 per i T_H2; l'IL-17 e l'IL-22 per i T_H17 (vedi Fig. 10-4). Le citochine prodotte dai linfociti T sono responsabili sia delle funzioni effettrici sia del ruolo patogenetico delle rispettive sottopopolazioni T_H e partecipano inoltre al loro sviluppo e espansione (vedi più avanti).

Ognuna delle sottopopolazioni di linfociti $CD4^+$: T_H1, T_H2 e T_H17 è dotata di una specifica configurazione molecolare, in larga parte definita dai recettori delle chemochine e dalle molecole di adesione che ne indirizzano la migrazione verso i diversi focolai di infezione. Abbiamo discusso il controllo della migrazione dei linfociti nel Capitolo 3. I linfociti T_H1, ma non i T_H2, esprimono i recettori chemochinici CXCR3 e CCR5, che si legano ai rispettivi ligandi prodotti principalmente durante le risposte immunitarie innate. Ne consegue che i linfociti T_H1 saranno più abbondanti

nei focolai di infezione dove l'agente infettivo avrà evocato una forte risposta immunitaria innata; tali agenti includono molti batteri e virus. I linfociti T_H1 esprimono inoltre i ligandi della E-selectina e della P-selectina, che contribuiscono alla loro migrazione ai siti di forte infiammazione (dove le selectine sono espresse sull'endotelio). Al contrario, i linfociti T_H2 esprimono i recettori chemochinici CCR3, CCR4 e CCR8 che riconoscono le chemochine espresse ad alti livelli, preferenzialmente nei focolai delle infezioni da elminti o durante le reazioni allergiche, particolarmente nelle mucose, dove i linfociti T_H2 tenderanno quindi a migrare. I linfociti T_H17 esprimono il recettore CCR6 che lega la chemochina CCL20, a sua volta prodotta da diverse cellule tissutali e dai macrofagi in alcune infezioni batteriche e fungine.

Queste popolazioni di linfociti T differenziati sono identificabili nelle reazioni immunitarie e hanno dato un importante contributo alla comprensione delle risposte linfocitarie. Ciò nonostante, l'idea che tutti i linfociti T $CD4^+$ possano essere classificati in sottopopolazioni chiaramente distinte sulla base di criteri ben definiti possiede delle limitazioni importanti.

- Molti effettori T $CD4^+$ producono combinazioni di citochine diverse da quelle caratteristiche di una singola sottopopolazione, oppure producono solo alcune delle citochine distintive di una popolazione, rendendone difficile l'assegnazione a una particolare classe. Per esempio, in molte reazioni infiammatorie, si possono avere linfociti T che producono sia l'IFN-γ (caratteristico dei linfociti T_H1) sia IL-17 (tipico dei linfociti T_H17). Di contro, alcuni linfociti possono produrre citochine non caratteristiche di alcuna delle tre sottopopolazioni (come IL-9) o solo alcune delle citochine prodotte da una particolare sottopopolazione (per esempio IL-22 in assenza di IL-17). Questi profili citochinici particolari hanno determinato l'espansione della nomenclatura usata per descrivere tali popolazioni (per esempio T_H9, T_H22 e così via). Non è chiaro se le popolazioni con un profilo citochinico eterogeneo o limitato rappresentino degli stadi intermedi nello sviluppo dei tre classici tipi di linfociti effettori o se costituiscano popolazioni a se stanti.

- È inoltre chiaro che alcuni di questi linfociti T effettori, in caso di modificazioni delle condizioni di attivazione, sono in grado di cambiare da un profilo citochinico in un altro. La portata e la significatività di tale plasticità sono attualmente oggetto di studio.
- Sebbene i linfociti T $CD4^+$ effettori siano considerati i produttori di molte citochine nelle risposte immunitarie adattive sia protettive sia patologiche, le stesse citochine possono essere prodotte da altri tipi di linfociti, quali i linfociti T γδ e le cellule linfoidi innate (*Innate Lymphoid Cells*, ILC). Per esempio, in alcune reazioni infiammatorie caratterizzate da IL-17, i linfociti T_H17 $CD4^+$ rappresentano solo il 30-35% dei linfociti producenti citochine, mentre il resto è rappresentato da altre popolazioni cellulari.

Sviluppo dei linfociti T_H1, T_H2 e T_H17

I linfociti T_H1, T_H2 e T_H17 si sviluppano tutti a partire da linfociti T $CD4^+$ naïve in risposta a citochine presenti durante le fasi precoci della risposta immunitaria; il loro differenziamento coinvolge l'attivazione trascrizionale e la modificazione epigenetica dei geni per le citochine. Il processo di differenziamento, chiamato talora polarizzazione, può essere suddiviso in tre fasi: induzione, indirizzamento e amplificazione.

- ***Induzione***. Le citochine agiscono sui linfociti T stimolati dall'antigene e dalle molecole costimolatorie provocando la trascrizione dei geni che codificano per le citochine caratteristiche di ogni sottopopolazione cellulare.
- ***Indirizzamento***. Se la stimolazione da parte dell'antigene è sufficientemente prolungata, intervengono cambiamenti epigenetici che rendono i geni che codificano per le citochine, caratteristiche di ciascuna sottopopolazione, costantemente attivati. Al contrario, i geni codificanti citochine che non sono prodotte da quella particolare sottopopolazione linfocitaria rimangono inattivi. Sono proprio queste modificazioni epigenetiche che indirizzano il linfocita T verso un fenotipo effettore ben preciso.
- ***Amplificazione***. Le citochine prodotte da ciascuna sottopopolazione di linfociti T $CD4^+$ favoriscono lo sviluppo di quella determinata

sottopopolazione e inibiscono la generazione delle altre. Ne consegue l'accumulo di linfociti che appartengono a una singola sottopopolazione.

Di seguito elenchiamo alcune importanti caratteristiche del differenziamento dei linfociti T.

- ***Le citochine che guidano lo sviluppo delle sottopopolazioni di linfociti T CD4$^+$ sono prodotte dalle APC (principalmente cellule dendritiche e macrofagi) e da altre cellule del sistema immunitario (come cellule NK e basofili o mastociti) che si trovano nell'organo linfoide dove ha inizio la risposta***. La produzione di citochine (nonché l'espressione delle molecole costimolatorie) da parte delle cellule dendritiche che hanno incontrato microbi e presentano antigeni microbici, fa parte della risposta innata ai patogeni (vedi Cap. 4). Inoltre, ricordiamo che microbi diversi possono indurre la produzione di citochine diverse, probabilmente perché vengono riconosciuti da recettori differenti. Anche altre cellule dell'immunità innata, come le cellule NK e i mastociti, possono produrre citochine in grado di influenzare lo sviluppo delle sottopopolazioni di linfociti T.
- ***Anche stimoli diversi dalle citochine possono influenzare il differenziamento dei linfociti T helper***. Alcuni studi indicano che alcune sottopopolazioni di cellule dendritiche possono promuovere selettivamente il differenziamento in T_H1 o T_H2; lo stesso principio potrebbe valere per i linfociti T_H17. Inoltre, le caratteristiche genetiche dell'ospite influenzano profondamente il differenziamento dei linfociti T. Per esempio, particolari ceppi di topi inbred sviluppano risposte T_H2 contro microbi che stimolano invece il differenziamento in senso T_H1 nella maggior parte degli altri ceppi murini. Come conseguenza, questi particolari ceppi sono più sensibili alle infezioni da parte di microbi intracellulari (vedi Cap. 16).
- ***I profili citochinici distintivi delle diverse sottopopolazioni sono controllati da specifici fattori trascrizionali che attivano l'espressione genetica delle citochine, e da modificazioni della cromatina che influenzanono l'accesso ai promotori e agli elementi regolatori dei***

geni delle citochine a cui questi fattori trascrizionali si legano. I fattori trascrizionali vengono essi stessi attivati o indotti dagli stimoli generati dal recettore per l'antigene, dai recettori dell'immunità innata, dalle molecole costimolatorie e da altri recettori citochinici. Ciascuna sottopopolazione esprime un proprio pannello caratteristico di fattori trascrizionali. Inoltre, a mano a mano che una sottopopolazione procede nella polarizzazione, i loci genetici delle citochine distintive vanno incontro a modificazioni degli istoni (cambiamenti nei livelli di metilazione e acetilazione) e ad altri eventi di rimodellamento della cromatina, rendendo questi loci "accessibili" alla RNA polimerasi e ai fattori di trascrizione. Al contrario, i loci per altre citochine (quelle non prodotte da quella determinata sottopopolazione) vengono a trovarsi in uno stato cromatinico "inaccessibile". È possibile che i cambiamenti epigenetici che assicurano la produzione del pannello di citochine caratteristico di ciascuna sottopopolazione siano anche correlati alla stabilità del fenotipo: in questo caso, le sottopopolazioni sarebbero plastiche e intercambiabili fino al momento in cui questi cambiamenti non venissero resi definitivi.

- ***Ciascuna sottopopolazione di linfociti effettori produce citochine che promuovono il proprio sviluppo e al contempo inibiscono lo sviluppo delle altre sottopopolazioni***. Questa caratteristica fornisce ai linfociti T un potente meccanismo di amplificazione. Per esempio, l'IFN-γ secreto dai linfociti T_H1 favorisce l'ulteriore differenziamento in T_H1, mentre inibisce la generazione di cellule T_H2 e T_H17. In modo analogo, l'IL-4 prodotta dai linfociti T_H2 promuove il differenziamento verso T_H2, mentre l'IL-21 prodotta dai linfociti T_H17 favorisce il differenziamento verso T_H17. In altre parole, ciascuna sottopopolazione si autopromuove e inibisce lo sviluppo delle altre sottopopolazioni. Per questa ragione, una volta che una risposta immunitaria ha assunto un certo fenotipo, essa tende a polarizzarsi sempre più in quella direzione. Infatti, le polarizzazioni più spinte si ritrovano nelle infezioni croniche o nell'esposizione cronica ad antigeni ambientali, situazioni in cui la stimolazione è prolungata.
- ***Il differenziamento di ciascuna sottopopolazione è indotto dai tipi di microbi che rappresenteranno il bersaglio privilegiato di quella stessa***

popolazione. Per esempio, lo sviluppo di linfociti T_H1 è guidato dai microbi intracellulari, che rappresentano il bersaglio privilegiato delle risposte T_H1. Al contrario, il sistema immunitario risponde ai parassiti elmintici sviluppando linfociti T_H2 e le citochine prodotte da questi sono fondamentali per combattere gli elminti stessi. Analogamente, le risposte T_H17 sono indotte da alcuni batteri e funghi che vengono debellati proprio da queste cellule. La produzione e le funzioni effettrici di questi linfociti T differenziati rappresentano un'eccellente esemplificazione del concetto di specializzazione dell'immunità adattativa, ovvero la capacità di orchestrare contro ciascun patogeno il tipo di risposta più appropriato.

Dopo aver elencato questi concetti generali, procediamo con la descrizione dei segnali e dei meccanismi responsabili dello sviluppo di ciascuna sottopopolazione.

LINFOCITI T_H1

La sottopopolazione dei linfociti T_H1 è indotta dai microbi fagocitati e attiva gli stessi fagociti. Si tratta infatti della principale popolazione di linfociti T effettori coinvolta nella difesa dell'ospite da parte dei fagociti, la reazione centrale dell'immunità cellulo-mediata. Per lungo tempo i linfociti T_H1 sono stati considerati i mediatori chiave dell'immunità cellulare, anche se oggi si sa che anche altri linfociti T effettori contribuiscono a questa forma di difesa dell'ospite.

Sviluppo dei linfociti T_H1

Il differenziamento in senso T_H1 è guidato principalmente dalle citochine IL-12 e IFN-γ e avviene in risposta a microbi che attivano le cellule dendritiche, i macrofagi e le cellule NK (Fig. 10-5). Il differenziamento dei linfociti T $CD4^+$ attivati dall'antigene in cellule effettrici T_H1 è stimolato da molti batteri intracellulari (come *Listeria* e i micobatteri) e da alcuni parassiti (come *Leishmania*) che infettano le cellule dendritiche e i

macrofagi. Esso è inoltre stimolato dai virus e da antigeni proteici somministrati in presenza di forti adiuvanti. Una caratteristica comune di questo tipo di infezioni e immunizzazioni è la stimolazione di reazioni innate associate alla produzione di citochine quali l'IL-12, l'IL-18 e gli IFN di tipo I. Tutte queste citochine promuovono lo sviluppo dei linfociti T_H1, anche se probabilmente la più potente tra queste è l'IL-12, infatti topi knockout per IL-12 sono estremamente suscettibili a infezioni da microbi intracellulari. L'IL-18 sinergizza con l'IL-12 e sembra che gli IFN di tipo I siano importanti per il differenziamento T_H1 in risposta a infezioni virali, soprattutto nell'uomo. Altri microbi stimolano le cellule NK a produrre l'IFN-γ, il quale, oltre a essere un potente induttore T_H1, agisce anche sulle cellule dendritiche e sui macrofagi aumentando la secrezione di IL-12. Una volta che le cellule T_H1 si sono sviluppate, esse cominciano a secernere l'IFN-γ, promuovendo un ulteriore differenziamento T_H1 e amplificando fortemente la reazione. Inoltre, l'IFN-γ inibisce il differenziamento in senso T_H2 e T_H17 dei linfociti T $CD4^+$ naïve, favorendo così la polarizzazione della risposta immunitaria. I linfociti T possono ulteriormente aumentare la produzione di citochine da parte delle cellule dendritiche e dei macrofagi, infatti il CD40 ligando (CD40L) espresso sui linfociti T attivati può stimolare il CD40 espresso sulle APC innescando produzione di IL-12.

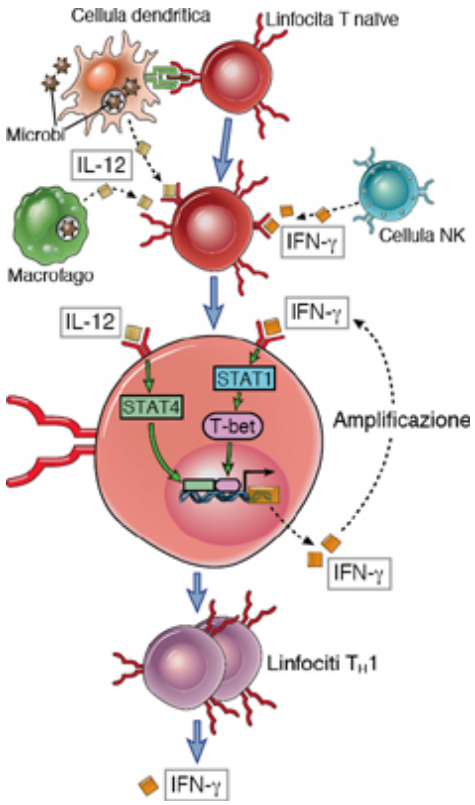


FIGURA 10-5 Sviluppo dei linfociti T_H1. L'IL-12, prodotta dalle cellule dendritiche e dai macrofagi in risposta ai microbi, per esempio quelli intracellulari, e l'IFN-γ, prodotto dalle cellule NK (ricordiamo che entrambe queste citochine sono parte integrante della risposta innata precoce contro i microbi) attivano i fattori trascrizionali T-bet, STAT1 e STAT4. Questi a loro volta stimolano il differenziamento dei linfociti T $CD4^+$ naïve verso la sottopopolazione T_H1. L'IFN-γ prodotto dagli stessi T_H1 amplifica questa risposta e inibisce lo sviluppo dei linfociti T_H2 e T_H17.

L'IFN-γ e l'IL-12 stimolano il differenziamento T_H1 attivando i fattori trascrizionali T-bet, STAT1 e STAT4 (vedi Fig. 10-5). Il fattore T-bet, un membro della famiglia dei fattori trascrizionali T-box, è indotto nei linfociti T $CD4^+$ naïve dal riconoscimento dell'antigene e dall'IFN-γ. L'IFN-γ attiva anche il fattore trascrizionale STAT1, il quale a sua volta stimola l'espressione del fattore T-bet. A questo punto, T-bet promuove la produzione di IFN-γ sia direttamente attraverso l'attivazione trascrizionale del gene, sia attraverso il rimodellamento cromatinico del promotore del gene di questa citochina. La capacità dell'IFN-γ di stimolare l'espressione del fattore T-bet e di quest'ultimo di aumentare la trascrizione dell'IFN-γ costituisce un meccanismo di amplificazione che guida il differenziamento dei linfociti T verso il fenotipo T_H1. L'IL-12 contribuisce a questo tipo di

differenziamento legandosi a recettori specifici espressi dai linfociti T $CD4^+$ attivati dal riconoscimento dell'antigene e attivando il fattore di trascrizione STAT4, che a sua volta aumenta ulteriormente la produzione di IFN-γ.

Funzioni dei linfociti T_H1

La principale funzione dei linfociti T_H1 è quella di attivare i macrofagi a fagocitare ed eliminare i microrganismi (Fig. 10-6). L'attivazione T_H1-dipendente dei macrofagi è anche coinvolta nell'ipersensibilità di tipo ritardato (*Delayed Type Hypersensitivity*, DHT), che si associa a numerosi disordini infiammatori, e nello sviluppo del granuloma, tipico della tubercolosi e di altre malattie infettive e infiammatorie. Questi processi patologici verranno descritti nel Capitolo 19. I linfociti T_H1, o i linfociti T helper follicolari che producono la citochina IFN-γ, stimolano la produzione di alcuni anticorpi IgG, in modo particolare nei roditori.

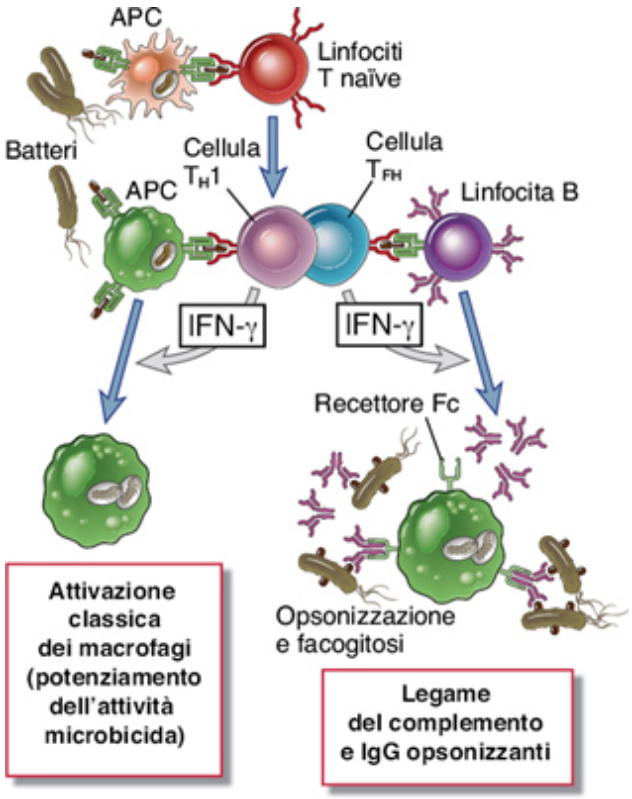


FIGURA 10-6 Funzioni dei linfociti T_H1. I linfociti T_H1 secernono l'IFN-γ, il quale agisce sui macrofagi e stimola la fagocitosi e l'eliminazione dei microrganismi nei fagolisosomi, mentre nei linfociti B stimola la produzione di anticorpi IgG che opsonizzano i microrganismi per la fagocitosi. La produzione di anticorpi potrebbe essere supportata non tanto dai classici linfociti T_H1, la maggior parte dei quali lascia gli organi linfoidi per migrare verso i siti di infezione e infiammazione, bensì dai linfociti T helper follicolari (T_{FH}) che rimangono negli organi linfoidi e che producono l'IFN-γ. Il ruolo di quest'ultimo nella produzioni di anticorpi è stato definito nel topo ma non nell'uomo. I linfociti T_H1 secernono anche il TNF, che attiva i neutrofili e amplifica l'infiammazione (non mostrato in figura).

Prima di descrivere l'attivazione dei macrofagi e le modalità attraverso le quali essi eliminano i microrganismi, descriveremo le proprietà dell'interferone-γ (IFN-γ), la citochina principalmente coinvolta nelle funzioni dei linfociti T_H1.

Interferone-γ

L'IFN-γ è la principale citochina per l'attivazione dei macrofagi e svolge importanti funzioni nella risposta immunitaria contro i microrganismi intracellulari. L'IFN-γ è anche denominato interferone immunitario o di tipo II. Esso non può essere considerato una potente citochina antivirale, nonostante il nome interferone implichi una modesta attività antivirale; la sua funzione principale è quella di attivare le cellule effettrici della risposta immunitaria.

L'IFN-γ è una proteina omodimerica appartenente alla famiglia delle citochine di tipo II (vedi Cap. 7). Oltre che i linfociti $CD4^+$ T_H1, anche le cellule natural killer (NK) e i linfociti T $CD8^+$producono l'IFN-γ. Le cellule NK secernono l'IFN-γ in risposta a molecole attivatrici presenti sulla superficie delle cellule dell'ospite che sono state infettate o alterate (vedi Cap. 4), oppure in risposta all'IL-12. In quest'ambito, l'IFN-γ agisce principalmente da mediatore dell'immunità innata. Nell'immunità specifica sono invece i linfociti T a produrre l'IFN-γ in risposta al riconoscimento dell'antigene e tale effetto può essere potenziato dalla contemporanea stimolazione da parte dell'IL-12 e dell'IL-18.

Il recettore per l'IFN-γ è composto da due catene polipeptidiche strutturalmente omologhe appartenenti alla famiglia del recettore per le citochine di tipo II e definite IFNγR1 e IFNγR2. L'IFN-γ lega le due catene

recettoriali e ne induce la dimerizzazione. Quest'ultima induce l'attivazione delle due chinasi JAK1 e JAK2 che sono associate alle catene recettoriali. L'attivazione di queste ultime porta alla fosforilazione e dimerizzazione del fattore trascrizionale STAT1 che induce la trascrizione di diversi geni (vedi Cap. 7). I geni indotti dall'IFN-γ codificano per molte proteine coinvolte nella regolazione di diverse attività biologiche (vedi più avanti).

Le funzioni dell'IFN-γ sono importanti per le risposte cellulo-mediate nei confronti dei microrganismi intracellulari (vedi Fig. 10-6).

- ***L'IFN-γ attiva i macrofagi a eliminare i microrganismi fagocitati***. L'attivazione dei macrofagi che determina un aumento dell'attività microbicida è chiamata **attivazione classica dei macrofagi**, contrapposta a una via di attivazione alternativa indotta dalle citochine dei linfociti T_H2; questi tipi di attivazione macrofagica sono descritti in maggiore dettaglio in seguito. Nelle risposte immunitarie innate, l'IFN-γ viene prodotto dalle cellule NK e attiva i macrofagi agendo insieme a segnali generati dai microrganismi e trasdotti nelle cellule dai recettori Toll-like (*Toll-Like Receptors*, TLR; vedi Cap. 4). Nell'immunità acquisita cellulo-mediata, l'IFN-γ prodotto dai linfociti T_H1 agisce insieme a CD40L (anch'esso espresso sulla superficie dei linfociti T) per indurre l'attivazione dei macrofagi.
- ***Agendo sui linfociti B, l'IFN-γ promuove lo scambio isotipico verso alcune sottoclassi di IgG, in particolare IgG2a o IgG2c (nel topo), inibendo al contempo lo scambio verso isotipi IL-4-dipendenti come le IgE***. Le sottoclassi di IgG indotte dall'IFN-γ si legano ai recettori per l'Fcγ espressi dai fagociti e sono anche in grado di attivare il complemento. Entrambi questi meccanismi favoriscono la fagocitosi dei microrganismi opsonizzati (vedi Cap. 12). Quindi, l'IFN-γ favorisce le risposte immunitarie anticorpali che contribuiscono all'eliminazione dei microrganismi e ciò avviene in concerto con la capacità di questa citochina di attivare direttamente i fagociti. Il meccanismo di scambio isotipico e il ruolo delle citochine in tale processo verranno descritti nel Capitolo 12. La principale fonte di IFN-γ nelle risposte anticorporali sembrerebbero essere i linfociti T helper follicolari, e non i classici linfociti T_H1 (vedi Cap. 12). L'azione dell'IFN-γ sui linfociti B è stata meglio caratterizzata nel topo rispetto che nell'uomo.

- ***L'IFN-γ promuove lo sviluppo dei linfociti T CD4$^+$ verso la sottopopolazione T_H1 inibendo quello verso le sottopopolazioni T_H2 e T_H17***. Questa azione dell'IFN-γ serve ad amplificare la risposta T_H1 ed è stata descritta in precedenza.
- ***L'IFN-γ induce l'espressione di diverse proteine che contribuiscono a migliorare la presentazione dell'antigene in associazione a molecole MHC e a innescare e amplificare le risposte immunitarie T-dipendenti*** (vedi Fig. 6-9). Queste proteine includono le molecole MHC stesse e molte altre proteine coinvolte nel processamento dell'antigene, quali il trasportatore associato al processamento dell'antigene (*Transporter Associated with antigen Processing*, TAP), i componenti del proteasoma, HLA-DM e le molecole costimolatorie B7 sulle APC.

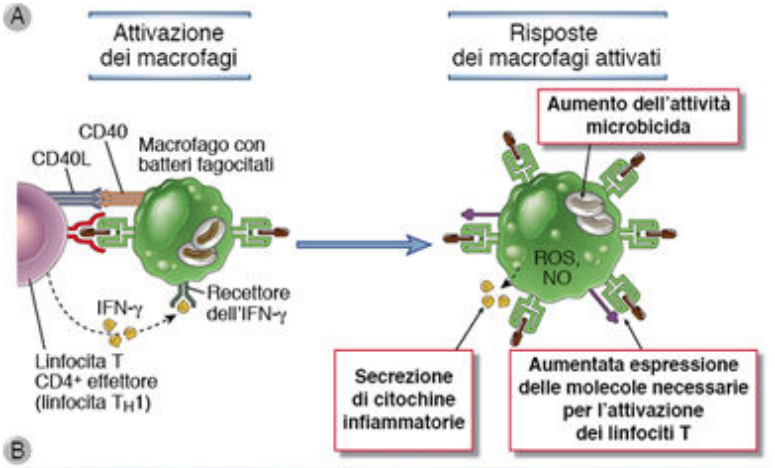
Complessivamente, le diverse azioni dell'IFN-γ causano un miglioramento dell'ingestione dei microrganismi e la loro eliminazione. Gli individui affetti da rare mutazioni ereditarie che inattivano il recettore per l'IFN-γ e i topi knockout geneticamente deficitari per l'IFN-γ, per il suo recettore o per molecole necessarie alla differenziazione dei linfociti T_H1 o coinvolte nella trasduzione del segnale innescato da IFN-γ (IL-12 o il suo recettore, T-bet o STAT1) sono maggiormente suscettibili a infezioni da parte di microrganismi intracellulari (come i micobatteri) a causa della compromessa attività microbicida dei macrofagi.

Altre citochine T_H1

Oltre all'IFN-γ, i linfociti T_H1 producono il TNF e varie chemochine che contribuiscono al reclutamento dei leucociti e a intensificare la risposta infiammatoria. Risulta in qualche modo sorprendente che i linfociti T_H1 rappresentino anche un'importante fonte di IL-10, la cui principale funzione è quella di inibire le cellule dendritiche e i macrofagi, sopprimendo quindi l'attivazione dei linfociti T_H1 stessi. Questo è un chiaro esempio di regolazione a feedback negativo delle risposte T-dipendenti.

Attivazione classica dei macrofagi da parte dei linfociti T_H1 ed eliminazione dei microrganismi fagocitati

I linfociti T_H1 attivano i macrofagi per mezzo di segnali generati dall'interazione CD40L-CD40 e dell'IFN-γ (Fig. 10-7). In risposta alla stimolazione da parte dell'antigene i linfociti T_H1 esprimono sulla loro superficie il CD40L e secernono l'IFN-γ. L'azione di quest'ultimo sui macrofagi (già descritta) sinergizza con quella del CD40L, facendo in modo che l'IFN-γ e CD40L diventino dei potenti stimoli per l'attivazione macrofagica. I segnali derivati dal CD40 attivano i fattori di trascrizione NF-κB (*Nuclear Factor κB*) e AP-1 (*Activation Protein 1*) e, come discusso in precedenza, l'IFN-γ attiva il fattore di trascrizione STAT1. Questi fattori di trascrizione stimolano l'espressione di diversi enzimi contenuti nei fagolisosomi dei macrofagi, quali: l'ossidasi fagocitica che catalizza la sintesi delle specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS); l'ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS), che stimola la produzione di ossido nitrico (NO) ed enzimi lisosomali. La necessità dell'interazione CD40L-CD40 per l'attivazione macrofagica fa sì che i macrofagi che presentano l'antigene ai linfociti T (per esempio i macrofagi che albergano batteri intracellulari) siano anche quelli che si trovano in contatto con questi ultimi e quindi quelli più efficacemente attivati dagli stessi.



B

Risposta dei macrofagi	Ruolo nell'immunità cellulo-mediata
Produzione di specie reattive, dell'ossigeno, dell'ossido nitrico, aumento dell'espressione degli enzimi lisosomiali	Uccisione dei microbi nei fagolisosomi (funzione effettrice dei macrofagi)
Secrezione delle citochine (TNF, IL-1, IL-12) e delle chemochine	TNF, IL-1, chemochine: reclutamento dei leucociti (infiammazione) IL-12: differenziazione T_H1, produzione dell'IFN-γ
Aumentata espressione delle molecole costimolatorie B7, delle molecole MHC	Aumentata attivazione dei linfociti T (amplificazione della risposta T)

FIGURA 10-7 Attivazione dei macrofagi da parte dei linfociti T_H1. A. Una volta attivati dall'IFN-γ prodotto dai linfociti T_H1 e dalle interazioni CD40L/CD40, i macrofagi svolgono numerose funzioni che mirano all'eliminazione dei microrganismi, stimolano inoltre l'infiammazione e potenziano la capacità di presentare l'antigene. **B**. Si elencano le principali risposte dei macrofagi attivati attraverso la via di attivazione classica e il loro ruolo nelle risposte protettive dei linfociti T. I macrofagi vengono inoltre attivati a esercitare funzioni simili durante le risposte innate (vedi Cap. 4).

I macrofagi attivati eliminano i microrganismi fagocitati, soprattutto attraverso la produzione di ROS, NO ed enzimi lisosomiali. Tutti questi potenti agenti microbicidi sono prodotti dai macrofagi all'interno dei lisosomi ed eliminano il microrganismo ingerito solo dopo che il fagosoma si è fuso con il lisosoma (vedi Fig. 4-12). Queste sostanze tossiche possono essere rilasciate anche nel tessuto circostante, dove possono uccidere i microrganismi extracellulari, ma possono anche rendersi responsabili dei danni tissutali.

Le immunodeficienze ereditarie, come anche i modelli murini di knockout genico, hanno definito il ruolo fondamentale dell'interazione CD40-CD40L, in aggiunta all'IFN-γ, nell'immunità cellulo-mediata contro i microbi intracellulari. Gli individui con mutazioni ereditarie del CD40L (**sindrome da iper-IgM legata al cromosoma X**) e i topi knockout per i geni che codificano per CD40 o per CD40L sono altamente sensibili alle infezioni da parte di microbi intracellulari altrimenti innocui, tra cui il fungo intracellulare *Pneumocystis jiroveci* (vedi Cap. 21), che necessita dell'attivazione macrofagica da parte dei linfociti T per eradicare l'infezione. Come è lecito attendersi, questi pazienti, così come i topi knockout, presentano anomalie anche nella produzione anticorpale che dipende dalla cooperazione con i linfociti T.

I macrofagi attivati sono coinvolti in numerose altre reazioni delle difese dell'ospite (Fig. 10-7). Essi stimolano l'infiammazione attraverso la secrezione di citochine, principalmente il TNF, l'IL-1, le chemochine e i mediatori lipidici a breve emivita, come il fattore di attivazione piastrinica, le prostaglandine e i leucotrieni. L'azione complessiva di queste molecole di derivazione macrofagica è quella di potenziare ulteriormente il reclutamento dei monociti come strategia per favorire l'eliminazione dell'agente patogeno. I macrofagi attivati *amplificano la risposta immunitaria cellulo-mediata* aumentando l'efficienza delle proprie funzioni di APC, grazie all'aumento dell'espressione delle molecole coinvolte nel processamento

dell'antigene, delle molecole di istocompatibilità di classe II (MHC-II), di quelle costimolatorie e delle citochine (come l'IL-12) che stimolano la differenziazione dei linfociti T in cellule effettrici.

Un certo grado di danno tissutale accompagna sempre le risposte immunitarie cellulo-mediate di tipo T_H1, perché i prodotti microbicidi liberati dai macrofagi attivati e dai neutrofili non sono in grado di discriminare tra batteri e tessuto dell'ospite. Comunque, in condizioni normali il danno è limitato sia per estensione sia per durata e scompare a mano a mano che l'infezione si risolve. Al contrario, come già detto, l'ipersensibilità di tipo ritardato è un esempio di reazione mediata dai linfociti T_H1 che può causare un significativo danno tissutale (vedi Cap. 19).

LINFOCITI T_H2

La sottopopolazione T_H2 è responsabile della cosiddetta difesa fagocito-indipendente, dove gli eosinofili e i mastociti svolgono un ruolo centrale. Queste reazioni sono importanti per l'eradicazione delle infezioni elmintiche e forse anche per l'eliminazione di altri microbi a livello delle mucose. Svolgono inoltre un ruolo centrale nello sviluppo delle malattie allergiche (vedi Cap. 20)

Sviluppo dei linfociti T_H2

Il differenziamento dei linfociti T_H2, stimolato dalla citochina IL-4, avviene in risposta a elminti e allergeni (Fig. 10-8). Gli elminti e gli allergeni determinano una stimolazione cronica dei linfociti T, spesso in assenza di significative risposte innate o di attivazione macrofagica necessarie per il differenziamento in senso T_H1. Perciò, i linfociti T_H2 si possono sviluppare in risposta a microbi e antigeni che causano una stimolazione persistente o ripetuta dei linfociti T in assenza di un'importante infiammazione o della produzione di citochine proinfiammatorie che caratterizzano le risposte T_H1 e T_H17. A questo punto ci si deve porre una domanda: dato che il differenziamento in senso T_H2 dipende dalla presenza

dell'IL-4 e che i linfociti T_H2 differenziati costituiscono la principale fonte di questa citochina, da dove arriva l'IL-4 prima dello sviluppo della popolazione T_H2? In alcune situazioni, come per esempio nel corso di infezioni elmintiche, l'IL-4 è prodotta dai mastociti e probabilmente anche altre popolazioni cellulari, come le cellule linfoidi innate (ILC), possono contribuire allo sviluppo T_H2. Un'altra possibilità è che i linfociti T $CD4^+$ stimolati dall'antigene comincino immediatamente a produrre piccole quantità di IL-4: nel caso in cui l'antigene sia persistente e abbondante, la concentrazione locale di IL-4 aumenterà gradualmente. Inoltre, l'assenza di una risposta infiammatoria e della concomitante produzione di IL-12 determina un progressivo differenziamento in senso T_H2. Una volta che i linfociti T_H2 si sono sviluppati, l'IL-4 da essi prodotta amplifica la reazione e inibisce lo sviluppo dei linfociti T_H1 e T_H17.

Il differenziamento dei linfociti T_H2 dipende dall'IL-4, la quale agisce attivando il fattore di trascrizione STAT6 che, insieme ai segnali generati dal TCR, induce l'espressione di GATA-3 (Fig. 10-8). GATA-3 è un fattore di trascrizione che agisce da principale regolatore del differenziamento in senso T_H2 attivando la trascrizione dei geni che codificano per le citochine T_H2 IL-4, IL-5 e IL-13, localizzati sullo stesso locus genico. Il fattore GATA-3 può sia interagire direttamente con i promotori di questi geni sia rimodellare la cromatina, rendendo accessibili alcune sequenze ad altri fattori di trascrizione. Tutto ciò è simile ai meccanismi attraverso i quali il fattore T-bet regola l'espressione dell'IFN-γ. Il fattore GATA-3 indirizza stabilmente il differenziamento dei linfociti T in senso T_H2 aumentando la sua stessa espressione attraverso un meccanismo a feedback positivo. Inoltre, blocca il differenziamento T_H1 inibendo l'espressione della catena responsabile della trasduzione del segnale del recettore dell'IL-12. Topi knockout per i geni che codificano per IL-4, STAT6 o GATA-3 mostrano risposte T_H2 profondamente ridotte.

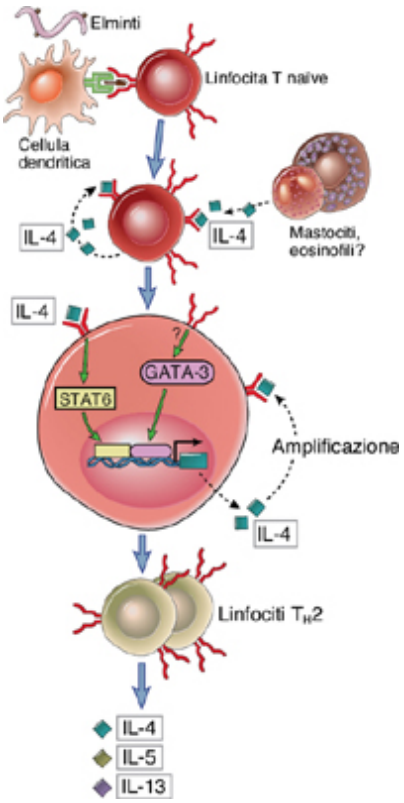


FIGURA 10-8 Sviluppo dei linfociti T_H2. L'IL-4, prodotta dagli stessi linfociti T attivati o dai mastociti e dagli eosinofili, specialmente in risposta agli elminti, attiva i fattori trascrizionali GATA-3 e STAT6. Questi a loro volta stimolano il differenziamento dei linfociti T $CD4^+$ naïve nella sottopopolazione T_H2. L'IL-4 prodotta dagli stessi T_H2 amplifica questa risposta e inibisce lo sviluppo di linfociti T_H1 e T_H17.

Funzioni dei linfociti T_H2

I linfociti T_H2 stimolano le reazioni immunitarie protettive nei confronti delle infezioni elmintiche mediate dalle IgE, dai mastociti e dagli eosinofili (Fig. 10-9). Gli elminti sono di dimensioni troppo grandi per poter essere fagocitati dai macrofagi o dai neutrofili e sono generalmente più resistenti all'attività microbicida di queste cellule rispetto alla maggior parte dei batteri e dei virus. Quindi si sono dovuti sviluppare meccanismi microbicidi speciali per la difesa contro queste infezioni. La funzione dei linfociti T_H2 dipende dall'IL-4, una citochina che promuove la produzione degli antocorpi della classe IgE, dall'IL-5, che attiva gli eosinofili, e dall'IL-13, che svolge diverse funzioni. Descriveremo prima le proprietà di queste citochine e quindi il loro ruolo nella difesa dell'ospite.

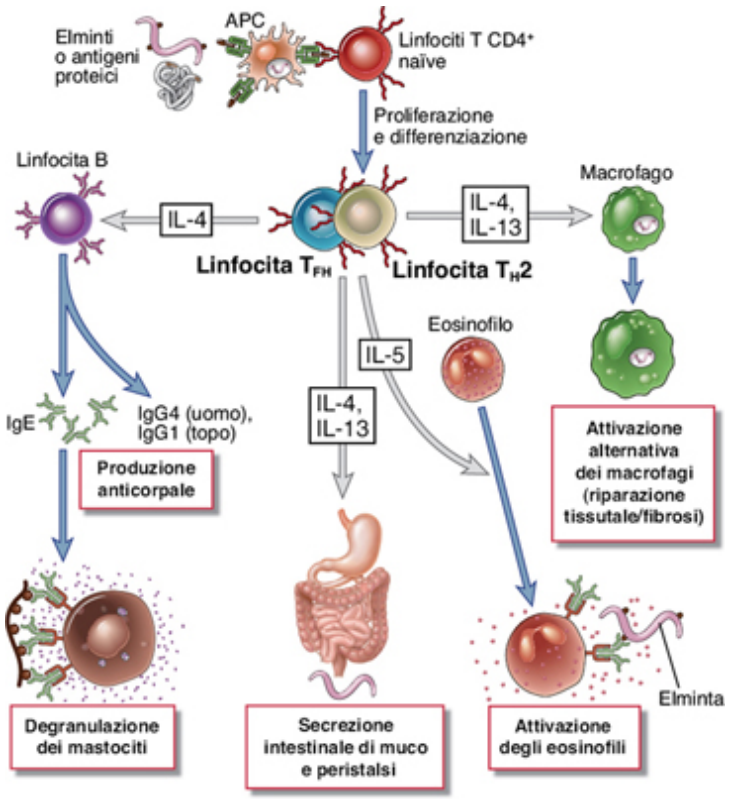


FIGURA 10-9 Funzioni dei linfociti T_H2. I linfociti T $CD4^+$ differenziati in T_H2 secernono l'IL-4, l'IL-5 e l'IL-13. L'IL-4 (e l'IL-13) agiscono sui linfociti B stimolando la produzione di anticorpi che si legano ai mastociti, quali le IgE. La produzione di anticorpi potrebbe essere supportata dai linfociti T_{FH} che producono citochine T_H2 e che risiedono negli organi linfoidi, ma non dai classici linfociti T_H2. Inoltre, l'IL-4 agisce da fattore di crescita e differenziazione autocrino per gli stessi linfociti T_H2. L'IL-5 attiva gli eosinofili, una funzione importante per la difesa contro le infezioni da elminti. L'IL-4 e l'IL-13 sono coinvolte nell'immunità di barriera, inducono l'attivazione alternativa dei macrofagi e inibiscono l'attivazione classica dei macrofagi da parte dei linfociti T_H1.

Interleuchina-4

L'IL-4 è la citochina più rappresentativa dei linfociti T_H2 e può agire sia come induttore sia come effettore di queste cellule. L'IL-4 è un membro della famiglia delle citochine di tipo I a quattro domini ad α-elica. Le principali cellule produttrici di IL-4 sono i linfociti T $CD4^+$ T_H2 e i mastociti attivati, ma questa citochina può essere prodotta anche da altre cellule tissutali. Il recettore per l'IL-4 espresso dalle cellule linfoidi è formato da una catena α, appartenente alla famiglia dei recettori per le citochine di tipo I, e dalla catena γ_c condivisa da altri recettori per le citochine. Questo

recettore, definito IL-4Rαγ_c, trasduce il segnale attraverso la via JAK-STAT che coinvolge JAK1, JAK3 e STAT6 e una seconda via che coinvolge IRS-2 (*Insulin Response Substrate 2*). STAT6 induce la trascrizione dei geni responsabili di molte delle funzioni biologiche di questa citochina. L'IL-4 è inoltre in grado di legare il recettore per l'IL-13 (vedi più avanti).

L'IL-4 svolge importanti funzioni agendo su diversi tipi cellulari.

- ***Nei linfociti B, l'IL-4 promuove lo scambio isotipico della catena pesante delle immunoglobuline verso la classe IgE***. I meccanismi dello scambio di classe sono descritti nel Capitolo 12. Nei topi knockout per il gene che codifica per l'IL-4 si osserva una drastica riduzione dei livelli basali di IgE (meno del 10% rispetto ai livelli normali). Gli anticorpi della classe IgE sono i principali effettori della difesa esercitata dagli eosinofili contro le infezioni da elminti (e da alcuni artropodi). Le IgE rappresentano anche il principale mediatore delle reazioni di ipersensibilità immediata (allergia). Ne consegue che la produzione di IL-4 è coinvolta nello sviluppo delle allergie (vedi Cap. 20). L'IL-4 stimola inoltre lo scambio isotipico verso l'IgG4 nell'uomo (o verso l'omologa classe IgG1 nel topo). Sempre nel topo, l'IL-4 inibisce lo scambio isotipico verso le IgG2a e IgG2c, che invece sono stimolate dall'IFN-γ. Questo rappresenta solo un esempio delle numerose attività di antagonismo reciproco tra queste due citochine. Anche l'IL-13 può contribuire allo scambio di classe verso le IgE. Le cellule effettrici che stimolano lo scambio isotipico potrebbero essere i linfociti T_{FH} che producono IL-4, e forse IL-13, e non i classici linfociti T_H2 (vedi Cap. 12).
- ***L'IL-4 induce lo sviluppo dei linfociti T_H2 a partire dai linfociti T CD4$^+$ naïve e funziona da fattore di crescita autocrino per i linfociti T_H2 effettori***. Tale funzione è già stata descritta in precedenza.
- ***L'IL-4, insieme all'IL-13, contribuisce a una forma alternativa di attivazione dei macrofagi diversa da quella innescata dall'IFN-γ***. L'IL-4 e l'IL-13 sopprimono l'attivazione classica dei macrofagi causata dall'IFN-γ inibendo le difese contro i microrganismi intracellulari.

- ***L'IL-4 e l'IL-13 stimolano la peristalsi del tratto gastrointestinale e l'IL-13 stimola anche la secrezione di muco da parte delle cellule epiteliali dell'intestino e delle vie aeree superiori***. Entrambi i processi contribuiscono all'eliminazione dei microrganismi presenti sulla superficie epiteliale.
- ***L'IL-4 e l'IL-13 inducono il reclutamento dei leucociti***, principalmente eosinofili, promuovendo l'espressione di molecole di adesione sull'endotelio e la secrezione di chemochine che legano i recettori espressi dagli eosinofili.

Interleuchina-13

L'IL-13 è una citochina strutturalmente e funzionalmente correlata all'IL-4, che svolge un ruolo importante nella difesa immunitaria contro gli elminti (vedi Cap. 16) e nell'insorgenza di malattie su base allergica (vedi Cap. 20). L'IL-13 è un membro della famiglia delle citochine di tipo I a quattro α-eliche, dotata di una limitata omologia di sequenza, ma di una significativa omologia strutturale con l'IL-4. Essa è prodotta principalmente dai linfociti T_H2 ma anche da basofili, eosinofili e cellule NKT. La forma funzionale del recettore per l'IL-13 è rappresentata da un eterodimero composto dalla catena IL-4Rα e dalla catena IL-13Rα1. Questo complesso può legare con alta affinità sia l'IL-13 che l'IL-4 e trasdurre il segnale attraverso la via JAK1, JAK3 e STAT6. Il recettore IL-4Rα-IL-13Rα1 è espresso su un ampio spettro di cellule, inclusi linfociti B, fagociti mononucleati, cellule dendritiche, eosinofili, basofili, fibroblasti, cellule endoteliali e cellule epiteliali bronchiali. Al contrario, i linfociti T non esprimono il recettore per l'IL-13.

L'IL-13 agisce in concerto con IL-4 nella risposta immunitaria contro gli elminti e nei fenomeni infiammatori allergici. Alcune delle azioni dell'IL-13 si sovrappongono a quelle dell'IL-4, altre sono invece distinte. L'IL-13 sinergizza con l'IL-4 nell'indurre l'attivazione alternativa dei macrofagi che contribuisce alla riparazione dei tessuti e alla fibrosi. L'IL-13 stimola la produzione di muco da parte delle cellule epiteliali bronchiali, un processo che contribuisce alla patogenesi dell'asma. Come già detto, sia l'IL-13 sia l'IL-4 possono attivare lo scambio di classe verso le IgE e verso alcuni isotipi di IgG nei linfociti B, oltre che promuovere il reclutamento

leucocitario. A differenza dell'IL-4, l'IL-13 non è coinvolta nella differenziazione dei linfociti T_H2.

Interleuchina-5

L'IL-5 è un attivatore degli eosinofili e rappresenta il principale collegamento tra l'attivazione dei linfociti T e le risposte infiammatorie che coinvolgono gli eosinofili. L'IL-5 è un membro della famiglia delle citochine di tipo I ed è composta da un omodimero contenente 4 domini ad α-elica. Essa viene prodotta dai linfociti T_H2 e dai mastociti attivati. Il recettore per l'IL-5 è composto da una specifica subunità α e da una catena β comune (β_c), presente anche nel recettore per l'IL-3 e per il fattore stimolante le colonie di granulociti e macrofagi (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*, GM-CSF) (vedi Fig. 7-23). Il principale segnale trasdotto dall'IL-5 coinvolge l'attivazione di JAK3 e STAT3.

La principale azione biologica svolta dall'IL-5 è quella di stimolare la proliferazione e la differenziazione degli eosinofili e di indurre la loro attivazione una volta maturi. Gli eosinofili attivati esprimono sulla loro superficie recettori specifici per il frammento Fc delle IgE e di alcune IgG e sono quindi in grado di legare ed eliminare i microrganismi (principalmente gli elminti) opsonizzati da tali anticorpi. L'IL-5 stimola anche la proliferazione dei linfociti B e la produzione di IgA.

Ruolo dei linfociti T_H2 nella difesa dell'ospite

I linfociti T_H2 sono responsabili della difesa dell'ospite da infezioni elmintiche per mezzo di diversi meccanismi (vedi Fig. 10-9).

- ***Reazioni mediate da IgE ed eosinofili***. L'IL-4 e l'IL-13, secrete dai linfociti T_H2 o T_{FH}, stimolano la produzione di IgE specifiche per l'elminta, che lo opsonizzano e promuovono il suo riconoscimento da parte degli eosinofili. L'IL-5 attiva gli eosinofili e questi rilasciano il contenuto dei propri granuli, liberando così la proteina basica maggiore e la proteina cationica maggiore, che sono in grado di intaccare persino i robusti tegumenti degli elminti (vedi Capp. 16 e 20).

- ***Attivazione dei mastociti***. I mastociti esprimono recettori Fcε ad alta affinità che determinano la cattura delle IgE sulla propria superficie. Il legame degli antigeni alle IgE presenti sulla superficie del mastocita ne determina l'attivazione e quindi la degranulazione. Il contenuto dei granuli dei mastociti comprende amine vasoattive, citochine come il TNF, chemochine e mediatori lipidici, tutti in grado di indurre un'infiammazione locale che favorisce l'eliminazione del parassita. I mediatori secreti dai mastociti sono anche responsabili di alcune reazioni vascolari e dell'infiammazione che caratterizza le reazioni allergiche (vedi Cap. 20).
- ***Difesa dell'ospite a livello della barriera mucosale***. Le citochine prodotte dai linfociti T_H2 sono anche coinvolte nel bloccare l'entrata dei microrganismi nelle mucose e addirittura nel promuovere la loro espulsione aumentando la produzione di muco e la peristalsi intestinale. Pertanto, i linfociti T_H2 svolgono un importante ruolo nella cosiddetta **barriera immunitaria** (difese dell'ospite a livello delle barriere epiteliali rivolte verso l'ambiente esterno).
- ***Attivazione alternativa dei macrofagi***. L'IL-4 e l'IL-13 attivano i macrofagi a produrre quegli enzimi che catalizzano la sintesi del collageno e promuovono la fibrosi. L'attivazione dei macrofagi in risposta alle citochine rilasciate dai linfociti T_H2 è stata definita **attivazione alternativa** dei macrofagi (Fig. 10-10) per distinguerla da quella causata dall'IFN-γ che, essendo stata caratterizzata per prima, è stata invece definita *classica* e che determina una potente risposta microbicida e infiammatoria (vedi Fig. 10-7). I macrofagi alternativamente attivati possono innescare la riparazione tissutale a seguito di diversi tipi di danno tissutale. Questi macrofagi, nonché gli stessi linfociti T_H2, promuovono la cicatrizzazione e la fibrosi secernendo fattori di crescita che stimolano la proliferazione dei fibroblasti (come il fattore di crescita derivato dalle piastrine), la sintesi del collageno (come l'IL13 e il fattore di crescita trasformante-β [*Transforming Growth Factor*-β, TGF-β]), e la formazione di nuovi vasi sanguigni o angiogenesi (come il fattore di crescita dei fibroblasti). Le citochine rilasciate dai linfociti T_H2 sopprimono l'attivazione classica dei macrofagi e interferiscono con le risposte T_H1 protettive

verso le infezioni intracellulari (vedi Cap. 16). Ciò è dovuto, almeno in parte, al fatto che l'IL-4 stimola la produzione di citochine come l'IL-10 e il TGF-β da parte di macrofagi attivati in maniera alternatativa, che inibiscono lo sviluppo e la funzione dei linfociti T_H1.

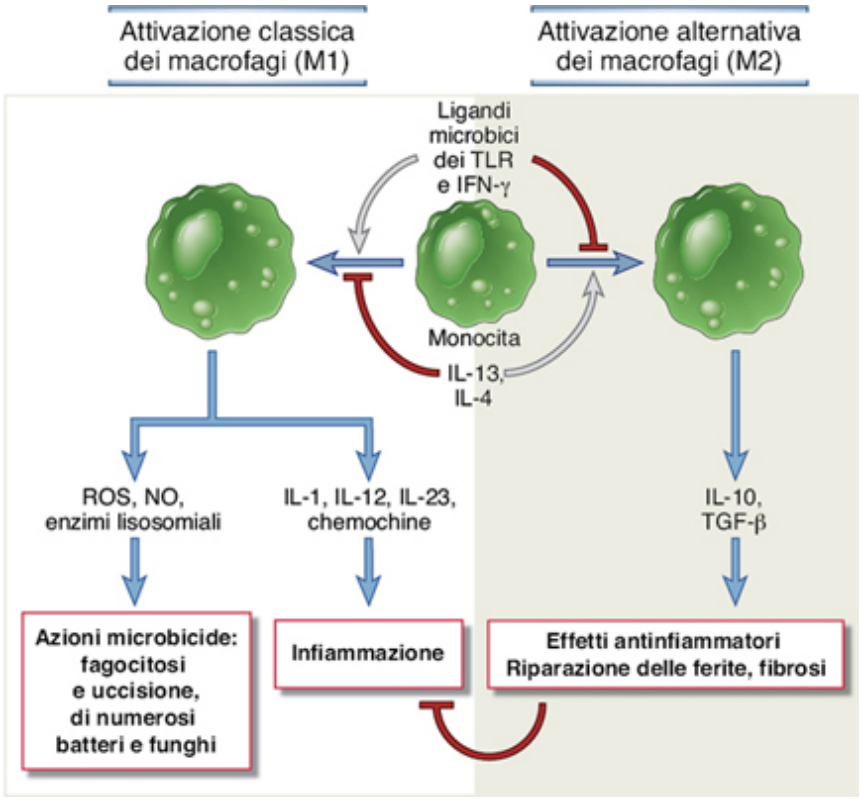


FIGURA 10-10 Attivazioni classica e alternativa dei macrofagi. Differenti stimoli attivano i monociti-macrofagi a differenziarsi in sottopopolazioni funzionalmente distinte. I macrofagi attivati per la via classica per mezzo di componenti microbiche e citochine (in particolare l'IFN-γ), acquisiscono capacità microbicida, ma sono anche coinvolti in processi infiammatori potenzialmente dannosi. I macrofagi attivati per la via alternativa per mezzo dell'IL-4 e l'IL-13 prodotte dai linfociti T_H2 e da altri leucociti svolgono la propria funzione nel controllo dell'infiammazione; inoltre possono promuovere la riparazione dei tessuti e sono coinvolti nei processi fibrotici.

LINFOCITI T_H17

La sottopopolazione di linfociti T_H17 è principalmente coinvolta nel reclutamento dei leucociti e nell'attivazione dell'infiammazione. Tali reazioni svolgono un ruolo essenziale per l'eliminazione dei batteri

extracellulari e dei funghi, e contribuiscono in maniera significativa alle malattie infiammatorie.

Sviluppo dei linfociti T_H17

Lo sviluppo dei linfociti T_H17 è stimolato da citochine proinfiammatorie prodotte in risposta a batteri e funghi (Fig. 10-11). Numerosi batteri e funghi agiscono sulle cellule dendritiche stimolando la produzione di citochine come l'IL-6, l'IL-1 e l'IL-23, le quali complessivamente promuovono la differenziazione dei linfociti T $CD4^+$ verso la sottopopolazione T_H17. Il riconoscimento dei glucani fungini da parte del recettore simil-lectinico Dect-1, espresso dalle cellule dendritiche, promuove il rilascio di queste citochine. Inoltre, la combinazione di citochine che guida lo sviluppo T_H17 può essere prodotta non solo in risposta a particolari microbi, quali i funghi, ma anche quando le cellule dendritiche fagocitano corpi apoptotici di cellule infettate da batteri e funghi. Mentre IL-6 e IL-1 stimolano le fasi iniziali del differenziamento T_H17, IL-23 potrebbe svolgere un ruolo più importante per la proliferazione e il mantenimento dei T_H17 effettori. Un aspetto sorprendente del differenziamento T_H17 è che la citochina antinfiammatoria TGF-β, prodotta da molti tipi cellulari (vedi Cap. 15), promuove lo sviluppo di linfociti T_H17, purché venga secreta in presenza di mediatori proinfiammatori come l'IL-6 e l'IL-1. Poiché il differenziamento T_H17 è inibito dall'IFN-γ e dall'IL-4, esso tende a essere soppresso in presenza di forti risposte T_H1 e T_H2.

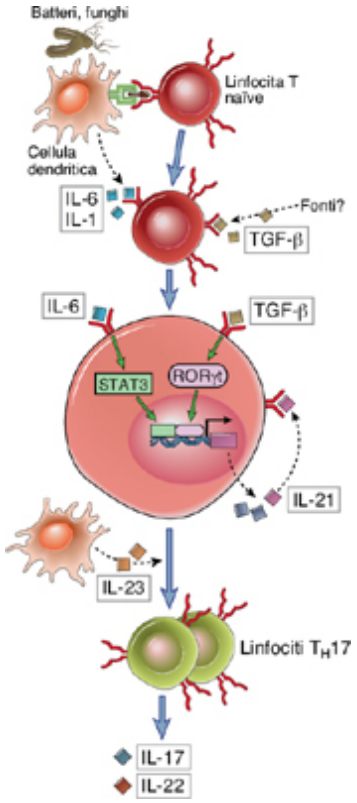


FIGURA 10-11 Sviluppo dei linfociti T_H17. L'IL-1 e l'IL-6, prodotte dalle APC, e il TGF-β, prodotto da diversi tipi cellulari, attivano i fattori trascrizionali RORγt e STAT3. Questi a loro volta stimolano il differenziamento dei linfociti T $CD4^+$ naïve in T_H17. L'IL-23, anch'essa prodotta dalle APC, in particolare in risposta ai funghi, stabilizza questa sottopopolazione. Il TGF-β sembrerebbe promuovere le risposte T_H17 in maniera indiretta attraverso la soppressione delle sottopopolazioni T_H1 e T_H2, entrambe in grado di inibire il differenziamento T_H17 (non schematizzato in figura). L'IL-21 prodotta dagli stessi T_H17 amplifica questa risposta.

Lo sviluppo dei linfociti T_H17 dipende dai fattori trascrizionali RORγt e STAT3 (Fig. 10-11). Il TGF-β e le citochine infiammatorie, soprattutto l'IL-6 e l'IL-1, cooperano per indurre la produzione del fattore RORγt, un fattore trascrizionale della famiglia del recettore dell'acido retinoico espresso esclusivamente dai linfociti T, talvolta chiamato RORc in quanto codificato dal gene *RORC*. Le citochine infiammatorie, l'IL-6 in particolare, attivano il fattore trascrizionale STAT3, il quale collabora con il fattore RORγt per originare la risposta T_H17.

I linfociti T_H17 sono particolarmente abbondanti nelle mucose, specialmente in quella del tratto gastrointestinale. Questa osservazione suggerisce che l'ambiente tissutale può essere importante per lo sviluppo

T_H17, probabilmente perché assicura adeguate concentrazioni locali di TGF-β e di citochine infiammatorie. Questa osservazione suggerisce che questa sottopopolazione possa essere particolarmente importante per combattere le infezioni intestinali e possa giocare un ruolo nello sviluppo dell'infiammazione in tale sede. Lo sviluppo di linfociti T_H17 nel tratto gastrointestinale è anche influenzato dalla popolazione microbica locale; è stato dimostrato che alcuni batteri commensali delle specie *Clostridium* sono induttori particolarmente potenti dei linfociti T_H17.

Funzioni dei linfociti T_H17

I linfociti T_H17 combattono i microbi arruolando leucociti, principalmente neutrofili, presso i siti di infezione (Fig. 10-12). I neutrofili rappresentano il principale meccanismo di difesa verso i batteri extracellulari e i funghi, e per questo motivo i linfociti T_H17 svolgono un ruolo particolarmente importante contro questi tipi di infezione. Molte delle azioni proinfiammatorie di queste cellule dipendono dall'IL-17, ma anche altre citochine prodotte da questa sottopopolazione di linfociti potrebbero essere coinvolte.

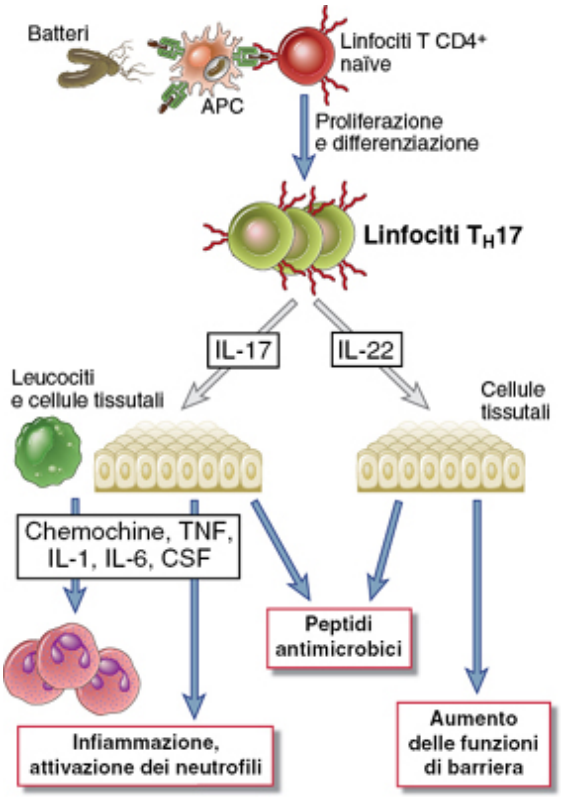


FIGURA 10-12 Funzione dei linfociti T_H17. Le citochine prodotte dai linfociti T_H17, migliorano la funzione della barriera epiteliale e promuovono la produzione di chemochine che reclutano i neutrofili e altri leucociti, e aumentano la produzione di peptidi antimicrobici (defensine).

Interleuchina-17

L'IL-17 è una citochina atipica che, come il suo recettore, non mostra elevati livelli di omologia con altre citochine o recettori per le citochine. La famiglia dell'IL-17 comprende sei citochine strutturalmente correlate, delle quali l'IL-17A e l'IL-17F possiedono il maggiore grado di omologia. Le funzioni immunologiche di questa famiglia di citochine sembrano essere dovute principalmente all'IL-17A. L'IL-17A e l'IL-17F sono prodotte principalmente dai linfociti T_H17, mentre gli altri membri della famiglia possono essere prodotti da diversi tipi cellulari. I recettori per l'IL-17 sono complessi multimerici espressi da un ampio spettro di tipi cellulari. La loro struttura e i loro segnali di trasduzione non sono stati ancora ben caratterizzati.

L'IL-17 rappresenta un importante collegamento tra l'immunità specifica e la risposta infiammatoria acuta, presentata nel Capitolo 4, in quanto una delle principali reazioni dell'immunità innata. Il termine infiammazione immunitaria è talvolta usato per indicare la forte reazione infiammatoria acuta che può accompagnare le risposte dei linfociti T; in molti casi, tali reazioni sono più accentuate rispetto a quanto si osserva nel contesto della sola immunità innata. l'IL-17 svolge diverse funzioni importanti per la difesa dell'ospite.

- ***L'IL-17 promuove un'infiammazione caratterizzata da una forte componente neutrofilica***. Essa stimola la produzione di chemochine e di altre citochine (come il TNF) che reclutano i neutrofili (e in misura minore i monociti) al sito di attivazione dei linfociti T. Inoltre stimola indirettamente la produzione di neutrofili aumentando la sintesi del fattore stimolante le colonie di granulociti (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*, G-CSF) e l'espressione del corrispondente recettore. I neutrofili reclutati ingeriscono e uccidono batteri e funghi.
- ***L'IL-17 stimola la produzione di sostanze antimicrobiche*** (incluse le defensine) da parte di diversi tipi cellulari (vedi Capp. 4 e 13).

Altre citochine prodotte dai linfociti T_H17

L'IL-22 fa parte della famiglia di citochine di tipo II a cui appartiene l'IL-10 ed è prodotta da linfociti T attivati (in particolare T_H17), da alcune cellule NK e dalle cellule linfoidi innate del gruppo 3. L'IL-22 è prodotta nei tessuti epiteliali (specialmente della cute e del tratto gastrointestinale) e mantiene l'integrità epiteliale promuovendo le funzioni di barriera meccanica degli epiteli, stimolando la loro riparazione e inducendo la produzione di peptidi anti-microrbici. L'IL-22 contribuisce anche all'infiammazione, in parte stimolando la produzione epiteliale di chemochine, e sembrerebbe essere quindi coinvolta nel danno tissutale nel contesto delle malattie infiammatorie.

L'IL-21 è prodotta dai linfociti T $CD4^+$ attivati (compresi i T_H17) e dai linfociti T helper follicolari. Essa esercita un ampio spettro di effetti biologici sui linfociti B, T e sulle cellule NK. Il recettore per l'IL-21 appartiene alla famiglia dei recettori per le citochine di tipo I, è composto da una catena ligando-specifica associata alla subunità γ_c. Esso attiva una via di trasduzione del segnale che coinvolge alcuni fattori JAK e STAT (in particolare STAT3). Un'importante funzione dell'IL-21 è svolta nella risposta anticorpale, specialmente in quelle risposte che avvengono nei centri germinativi (vedi Cap. 12). L'IL-21 è necessaria per la generazione dei linfociti T helper follicolari e stimola i linfociti B nei centri germinativi. È anche coinvolta nella differenziazione dei linfociti T_H17, specialmente nell'uomo, dove rappresenta un efficiente meccanismo autocrino per amplificare le risposte immunitarie associate ai linfociti T_H17. Alcune altre funzioni note dell'IL-21 comprendono l'aumento della proliferazione, della differenziazione e delle funzioni effettrici dei linfociti T $CD8^+$ e delle cellule NK.

Ruolo dei linfociti T_H17 nella difesa dell'ospite

La principale funzione effettrice dei linfociti T_H17 è quella di indurre l'infiammazione mediata dai neutrofili, che serve a eliminare batteri e funghi (vedi Fig. 10-12). I neutrofili reclutati fagocitano ed eliminano i microrganismi extracellulari. L'importanza del ruolo dei linfociti T_H17 è

illustrata dalla malattia ereditaria chiamata *sindrome di Giobbe* (o sindrome da iper IgE), causata da mutazioni del gene che codifica STAT3 e caratterizzata da un aumentata sensibilità alle infezioni cutanee causate da funghi e batteri. I pazienti affetti presentano ascessi cutanei multipli causati da batteri e funghi, che ricordano la biblica punizione inferta a Giobbe. I deficit della risposta T_H17 sono inoltre associati a candidiasi mucocutanee croniche.

I linfociti T_H1 e T_H17 collaborano all'eliminazione dei microbi da parte dei fagociti nell'immunità cellulo-mediata. Prima della scoperta della sottopopolazione T_H17 si pensava che l'immunità cellulo-mediata rientrasse nel campo d'azione dei linfociti T_H1, un concetto rafforzato da analisi sperimentali di questa reazione a livello della milza. Sappiamo oggi che nel caso di molte infezioni tissutali, i linfociti T_H17 sono probabilmente i linfociti T effettori più importanti per il reclutamento dei fagociti (neutrofili e monociti) ai siti di infezione. Tale processo è guidato dalle chemochine prodotte dai linfociti T e da cellule del tessuto in risposta alle citochine prodotte dai linfociti T ma anche in risposta ai microbi stessi. Una volta giunti al sito di infezione, i fagociti possono essere attivati alla fagocitosi dai linfociti T_H1 e uccidere i microbi.

I linfociti T_H17 contribuiscono alla patogenesi di molte malattie infiammatore. Le risposte dei linfociti T_H17 sono state associate a malattie quali la psoriasi, patologie infiammatorie dell'intestino, l'artrite reumatoide e la sclerosi multipla. Anticorpi in grado di bloccare lo sviluppo o la funzione dei linfociti T_H17 sono in sperimentazione clinica per la cura di molte di queste malattie e hanno mostrato una notevole efficacia nel caso della psoriasi. Questi antagonisti non sembrano essere efficaci contro le malattie infiammatorie intestinali e l'artrite reumatoide, così che il ruolo dei linfociti T_H17 nel contesto di tali patologie rimane da definire. La presenza e il contributo dei linfociti T_H1 e T_H17 nella patogenesi e nella progressione delle diverse malattie infiammatorie è un'area di attiva ricerca.

FUNZIONI DI ALTRE CLASSI DI LINFOCITI T

Oltre ai linfociti $CD4^+$ e $CD8^+$ esistono altre classi minoritarie di linfociti T dotate di caratteristiche distintive e probabilmente in grado di svolgere funzioni estremamente specializzate nella difesa dell'ospite. Di queste, quelle meglio conosciute sono i linfociti T γδ e le cellule NKT, dotate di caratteristiche condivise che le distinguono dai linfociti $CD4^+$ e $CD8^+$.

- I linfociti T γδ e le cellule NKT riconoscono un ampio spettro di antigeni, molti dei quali non sono di natura peptidica e non sono necessariamente presentati dalle APC in associazione a molecole MHC di classe I o II.
- I recettori per l'antigene (TCR) di molti linfociti T γδ e delle cellule NKT sono dotati di limitata diversificazione, suggerendo che entrambe queste sottopopolazioni si siano evolute per riconoscere un limitato gruppo di antigeni microbici. Per tali caratteristiche, questi linfociti T sono ritenuti una sorta di crocevia tra l'immunità innata e quella specifica.
- Entrambe le sottopopolazioni sono particolarmente abbondanti nei tessuti epiteliali, come l'apparato gastrointestinale.

Date le loro caratteristiche non comuni, è stato ipotizzato che i linfociti T γδ e NKT agiscano nell'ambito della difesa dell'ospite, con un ruolo simile a quello delle cellule linfoidi innate (ILC) (vedi Cap. 4). Le funzioni comuni sembrano includere:

- Difesa precoce contri i microbi incontrati nei tessuti epiteliali, prima che si siano sviluppate le risposte immunitarie adattive.
- Monitoraggio ed eliminazione delle cellule sottoposte a danno, quali cellule infettate o che hanno subito un danno del DNA.
- Produzione di citochine che influenzano successivamente le risposte immunitarie adattive.

Linfociti T γδ

Il recettore per l'antigene dei linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$ ristretti per MHC è un eterodimero composto da una catena α e una catena β (vedi Cap. 7). Esiste però anche un secondo tipo di recettore espresso in modo clonale formato da un eterodimero composto dalle catene γ e δ omologhe alle catene α e β dei

linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$. I linfociti T γδ rappresentano una sottopopolazione distinta dai più numerosi linfociti Tαβ. La percentuale delle cellule T γδ varia molto a seconda dei tessuti e della specie, ma in generale rappresenta meno del 5% di tutti i linfociti. Come per l'eterodimero αβ, anche l'eterodimero γδ si associa al CD3 e alla proteina ζ. Allo stesso modo, i segnali trasdotti nei linfociti T γδ sono simili a quelli dei linfociti αβ. Per quanto in linea teorica la potenziale diversificazione del TCR γδ possa essere maggiore di quella αβ, in realtà solo un numero limitato di regioni V delle catene γ e δ sono espresse dai cloni di queste cellule e la diversità giunzionale è estremamente limitata se non addirittura assente.

Nel corso dell'ontogenesi si possono sviluppare diverse sottopopolazioni di linfociti γδ dotate di diverse regioni V a livello del recettore per l'antigene e in grado di popolare tessuti diversi, anche se con una limitata capacità di ricircolo. Per esempio, nel topo, molti dei linfociti T γδ presenti a livello cutaneo si sviluppano nel corso della vita neonatale ed esprimono un TCR senza alcuna sostanziale diversificazione nelle regioni V, mentre molti dei linfociti T γδ presenti a livello della vagina, dell'utero e della lingua compaiono successivamente ed esprimono un TCR dotato di differenti regioni V. La limitata diversificazione dei TCR γδ in molti tessuti suggerisce che i ligandi di questi recettori potrebbero essere invariati o al limite conservati tra i tipi cellulari o i microbi che si incontrano comunemente nei tessuti. Una caratteristica singolare dei linfociti T γδ è la loro abbondanza nei tessuti epiteliali, almeno in alcune specie. Per esempio, più del 50% dei linfociti della mucosa dell'intestino tenue di topi e polli, denominati linfociti intraepiteliali, è costituito da linfociti T γδ. Sempre nel topo, molti dei linfociti T intraepidermici esprimono un TCR γδ. I linfociti T γδ non sono così abbondanti nell'uomo, dove solo il 10% circa dei linfociti T intraepiteliali dell'intestino esprime TCR γδ. I linfociti T γδ presenti negli organi linfoidi possiedono una diversificazione dei TCR maggiore di quelli presenti negli epiteli.

I linfociti T γδ non sono ristretti per MHC e non riconoscono gli antigeni di natura proteica. Alcuni cloni di linfociti T γδ riconoscono piccole molecole fosforilate, quali alchilamine e lipidi comunemente riscontrati nei micobatteri e in altri microrganismi, presentati da molecole MHC di classe I "non convenzionali". Altri riconoscono proteine o antigeni non proteici che non richiedono la processazione o la presentazione da parte delle APC. Molti

linfociti T γδ sono stimolati da proteine di origine batterica denominate *heat shock proteins*. È stato suggerito che i linfociti T γδ possano riconoscere antigeni presenti nei tessuti epiteliali che rappresentano l'interfaccia tra l'ospite e l'ambiente esterno.

Un certo numero di funzioni biologiche è stato associato ai linfociti T γδ, incluse la secrezione di citochine e l'eliminazione di cellule infettate, ma la reale funzione di questi linfociti rimane poco caratterizzata. È stato anche ipotizzato che negli epiteli questa sottopopolazione di linfociti T possa avviare la risposta immunitaria verso i microrganismi prima del reclutamento e dell'attivazione dei linfociti T αβ specifici per l'antigene. Topi geneticamente modificati, privi di linfociti T γδ non mostrano tuttavia alcun segno di immunodeficienza, se non un modesto aumento della suscettibilità alle infezioni provocate da alcuni batteri intracellulari. È interessante notare come nella psoriasi, una malattia infiammatoria della cute, l'IL-17 giochi un ruolo patogenetico importante: nel modello murino è stato possibile osservare come i primi linfociti che producono IL-17 siano proprio i linfociti T γδ. Non è ancora chiaro se questo sia vero per altri disturbi infiammatori, quali molecole riconoscano tali linfociti e in che modo essi contribuiscano allo sviluppo della malattia.

Cellule NKT

Una piccola popolazione di cellule T esprime marcatori come il CD56, normalmente espresso dalle cellule NK. Perciò queste cellule sono definite cellule NKT. Le catene α del TCR espresso da una frazione di cellule NKT presentano una limitata diversificazione e, nell'uomo, queste cellule sono caratterizzate da una regione V codificata da un unico segmento riarrangiato Vα24-Jα18, con minima o assente diversità giunzionale, associata a una delle tre catene β. A causa di questa limitata variabilità, queste cellule sono definite NKT invarianti (iNKT). Esistono inoltre altre cellule NKT caratterizzate dall'espressione di recettori per l'antigene abbastanza diversificati. In ogni caso, tutti i TCR delle cellule NKT riconoscono lipidi associati a molecole simili alle MHC di classe I, chiamate CD1. Le cellule NKT, come pure gli altri linfociti T specifici per antigeni di natura lipidica, sono in grado di produrre rapidamente citochine come l'IL-4 e l'IFN-γ e potrebbero quindi aiutare i linfociti B della zona marginale a produrre

anticorpi diretti contro gli antigeni lipidici. Le cellule NKT potrebbero anche svolgere, nell'ambito delle risposte innate, un'azione protettiva contro alcuni patogeni come i micobatteri (dotati di pareti cellulari ricche di lipidi). Le cellule iNKT, in particolare, sembrerebbero regolare le risposte immunitarie specifiche, principalmente mediante la secrezione di citochine. L'esatto ruolo di queste cellule nella risposta immunitaria protettiva e nelle malattie nell'uomo deve essere ancora definito.

Conclusa la discussione sulle funzioni dei linfociti T $CD4^+$ effettori e altre popolazioni di linfociti T meno comuni, nel Capitolo 11 prenderemo in considerazione le cellule effettrici $CD8^+$, il cui ruolo principale si realizza nella difesa contro le infezioni virali.

RIEPILOGO

* L'immunità cellulo-mediata rappresenta la risposta dell'immunità specifica da parte dei linfociti T e può essere trasferita da individui immunizzati a individui naïve attraverso i linfociti T ma non gli anticorpi.
* I linfociti T helper $CD4^+$ si possono differenziare in: cellule effettrici T_H1 che producono l'IFN-γ, che sono responsabili delle difese contro microbi intracellulari; cellule T_H2 che secernono l'IL-4 e l'IL-5, le quali favoriscono le risposte contro gli elminti mediate dalle IgE e dagli eosinofili/mastociti; cellule T_H17 che promuovono l'infiammazione e mediano le difese contro i funghi e i batteri extracellulari.
* Il differenziamento dei linfociti T $CD4^+$ naïve in sottopopolazioni è causato da citochine prodotte dalle APC e dai linfociti T stessi. Il programma di differenziamento è governato da fattori trascrizionali che promuovono l'espressione dei geni per le citochine e cambiamenti epigenetici nei loci genici delle citochine che si associano con l'indirizzamento stabile verso una particolare sottopopolazione. Ciascuna sottopopolazione produce citochine che stimolano il proprio sviluppo e contemporaneamente inibiscono quello delle altre sottopopolazioni, determinando così una sempre maggiore polarizzazione della risposta.
* I linfociti T_H1 $CD4^+$ riconoscono gli antigeni microbici che sono stati ingeriti e processati dai fagociti e attivano questi ultimi a eliminare il microrganismo stesso. L'attivazione dei macrofagi da parte dei linfociti T_H1 dipende dall'IFN-γ e dall'interazione CD40L-CD40. I macrofagi che hanno subito quella che viene definita l'attivazione classica eliminano i microrganismi fagocitati attraverso l'azione di enzimi e di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto. I macrofagi attivati possono ulteriormente stimolare l'infiammazione e rendersi responsabili di danno tissutale.
* I linfociti T $CD4^+$ T_H2 riconoscono gli antigeni prodotti da elminti e altri microrganismi, nonché antigeni ambientali associati alle allergie. L'IL-4, secreta dai linfociti T_H2 attivati

o dai linfociti T_{FH}, stimola nei linfociti B lo scambio di isotipo con produzione di IgE. Questi anticorpi possono rivestire l'elminta e indurre la degranulazione dei mastociti, stimolando l'infiammazione. L'IL-5, secreta dai linfociti T_H2 attivati, stimola direttamente gli eosinofili a rilasciare le sostanze contenute nei loro granuli che, se da una parte sono in grado di eliminare l'elminta, dall'altra possono anche danneggiare il tessuto dell'ospite. L'IL-4 e l'IL-13 cooperano per mantenere l'integrità morfofunzionale delle barriere epiteliali e sono responsabili dell'attivazione dei macrofagi definita alternativa, che genera cellule in grado di controllare l'infiammazione, di riparare i tessuti danneggiati e di indurre fibrosi.

* I linfociti T $CD4^+$ T_H17 causano risposte infiammatorie ricche di neutrofili efficaci nell'eradicare le infezioni da batteri extracellulari e funghi. I linfociti T_H17 sembrano svolgere un ruolo importante anche nel danno tissutale associato a patologie su base autoimmune.
* Entrambe le popolazioni T_H1 e T_H17 contribuiscono all'immunità cellulo-mediata, in cui ciascuna svolge ruoli distinti nell'eradicazione delle infezioni tramite i fagociti.
* I linfociti T γδ e NKT sono linfociti T che esprimono recettori con diversificazione limitata che riconoscono vari antigeni senza necessitare la presentazione associata a MHC. Queste cellule producono citochine ed è probabile che contribuiscano alla difesa dell'ospite e alle malattie infiammatorie

LETTURE CONSIGLIATE

Differenziazione e funzioni delle sottopopolazioni effettrici T $CD4^+$: T_H1, T_H2, e T_H17

Annunziato F.; Romagnani S: Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Research and Therapy* 11:257–264 (2009).

Baumjohann D.; Ansel K.M: Micro-RNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity. *Nature Reviews Immunology* 13:666–678 (2013).

Dong C: T_H17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nature Reviews Immunology* 8:337–348 (2008).

Kanno Y.; Golnaz V.; Hirahara K.; Singleton K.; O'Shea J.J: Transcriptional and epigenetic control of T helper cell specification: molecular mechanisms underlying commitment and plasticity. *Annual Review of Immunology* 30:707–731 (2012).

Korn T.; Bettelli E.; Oukka M.; Kuchroo V.K: IL-17 and T_H17 cells. Annual Review of Immunology 27:485–517 (2009).

Littman D.R.; Rudensky A.Y: T_H17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* 140:845–858 (2010).

Locksley R.M: Nine lives: plasticity among helper T cell subsets. *Journal of Experimental Medicine* 206:1643–1646 (2009).

McGeachy M.J.; Cua D.J: Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* 28:445–453 (2008).

Murphy K.M.; Stockinger B: Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nature Immunology* 11:674–680 (2010).

Paul W.E.; Zhu J: How are T_H2 responses initiated and amplified? *Nature Reviews Immunology* 10:225–235 (2010).

Pulendran B.; Artis D: New paradigms in type 2 immunity. *Science* 337:431–435 (2012).

Steinman L: A brief history of T_H17, the first major revision in the TH1/T_H2 hypothesis of T cell–mediated tissue damage. *Nature Medicine* 13:139–145 (2007).

Zhu J.; Yamane H.; Paul W.E: Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annual Review of Immunology* 28:445–489 (2010).

Attivazione dei macrofagi

Billiau A.; Matthys P: Interferon-γ: a historical perspective. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 20:97–113 (2009).

Gordon S.; Martinez F.O: Alternative activation of macrophages: mechanisms and functions. *Immunity* 32:593–604 (2010).

Sica A.; Mantovani A: Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation* 122:787–795 (2012).

Van Dyken S.J.; Locksley R.M: Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annual Review of Immunology* 31:317–343 (2013).

Altre popolazioni di linfociti T

Bendelac A.; Savage P.B.; Teyton L: The biology of NKT cells. *Annual Review of Immunology* 25:297–336 (2007).

Chien Y-H.; Meyer C.; Bonneville M: γδ T cells: first line of defense and beyond. *Annual Review of Immunology* 32:121–155 (2014).

Godfrey D.I.; Stankovic S.; Baxter A.G: Raising the NKT cell family. *Nature Immunology* 11:197–206 (2010).

Vantourout D.; Hayday A: Six-of-the-best: unique contributions of γδ T cells to immunology. *Nature Reviews Immunology* 13:88–100 (2013).

CAPITOLO 11

Differenziazione e funzioni dei linfociti T CD8$^+$ effettori

DIFFERENZIAZIONE DEI LINFOCITI T CD8$^+$ IN LINFOCITI T CITOTOSSICI

Natura dell'antigene e delle cellule che presentano l'antigene per l'attivazione dei linfociti T CD8$^+$

Ruolo dei linfociti T helper

Ruolo delle citochine

Inibizione delle risposte dei linfociti T CD8$^+$: il concetto di esaurimento funzionale dei linfociti T

FUNZIONI EFFETTRICI DEI LINFOCITI T CD8+ CITOTOSSICI

Meccanismi della citotossicità mediata da CTL

Produzione di citochine da parte dei linfociti CD8$^+$ effettori

RUOLO DEI CTL CD8$^+$ NELLA DIFESA DELL'OSPITE

RIEPILOGO

I virus si sono evoluti in modo da riuscire a utilizzare le molecole presenti sulla superficie cellulare per infettare le cellule dell'ospite e utilizzare i loro meccanismi genetici e di sintesi proteica per replicarsi e diffondersi da una cellula all'altra. I virus possono infettare e sopravvivere in un'ampia varietà di cellule, inoltre non possono essere eliminati se alle cellule infettate mancano i meccanismi microbicidi intrinseci o se i virus si trovano nel citosol, dove sono inaccessibili ai meccanismi di uccisione. In queste situazioni, l'unico modo per eradicare un'infezione è uccidere la cellula infettata, rilasciando il virus e impedendogli di sopravvivere e replicarsi. L'uccisione delle cellule che contengono virus nel citosol è mediata dai **linfociti T CD8$^+$ citotossici (CTL)**, le cellule effettrici della linea CD8$^+$ (vedi Fig. 10-1, *B*). Anche le citochine prodotte dai linfociti T CD8$^+$ effettori contribuiscono all'eliminazione di svariati microbi intracellulari. La seconda funzione più importante dei CTL CD8$^+$, oltre al ruolo che svolgono nella difesa contro i microbi, è l'eradicazione di molti tumori. Queste cellule svolgono anche un ruolo importante nel rigetto acuto degli allotrapianti d'organo.

Nel Capitolo 6 si è discussa la natura dei complessi peptide-MHC riconosciuti dai linfociti T CD8$^+$. Nel Capitolo 9 si sono esaminate le prime fasi dell'attivazione dei linfociti T. Sono state menzionate alcune caratteristiche dell'attivazione dei linfociti CD8$^+$, quali l'incredibile espansione clonale a cui vanno incontro in seguito al riconoscimento dell'antigene e di altri segnali. La differenziazione dei linfociti CD8$^+$ naïve, che ancora non sono in grado di uccidere, in CTL funzionali, ha diverse caratteristiche peculiari che dovrebbero essere considerate separatamente. In questo capitolo, prenderemo in esame il processo attraverso cui si generano CTL funzionalmente efficaci e come questi uccidano altre cellule; discuteremo quindi il ruolo dei CTL nella difesa dell'ospite.

DIFFERENZIAZIONE DEI LINFOCITI T CD8$^+$ IN LINFOCITI T CITOTOSSICI

L'attivazione dei linfociti T CD8$^+$ naïve richiede il riconoscimento dell'antigene associato a secondi segnali e segue passaggi molto simili a

quelli delle altre risposte dei linfociti T (Fig. 11-1). L'attivazione dei linfociti T $CD8^+$ naïve dipende da una via specifica di presentazione dell'antigene mediata da un tipo specializzato di cellule dendritiche e può anche necessitare dell'aiuto dei linfociti T $CD4^+$.

FIGURA 11-1 Induzione e fasi effettrici delle risposte dei linfociti T $CD8^+$. Induzione della risposta: i linfociti $CD8^+$ riconoscono negli organi linfoidi periferici peptidi presentati dalle cellule dendritiche. I linfociti T sono stimolati a proliferare e a differenziarsi in CTL (e linfociti della memoria), che entrano in circolo. Migrazione dei linfociti T-effettori e di altri leucociti verso il focolaio infettivo: i linfociti T effettori migrano nei tessuti sede di infezione, crescita tumorale o rigetto d'organo. Funzioni effettrici dei linfociti T: i CTL $CD8^+$ riconoscono l'antigene nei tessuti e rispondono uccidendo le cellule che lo producono.

La differenziazione dei linfociti T $CD8^+$ in CTL effettori prevede l'acquisizione dei meccanismi necessari per l'uccisione delle cellule bersaglio. La cellula infettata o tumorale che viene uccisa dai CTL è comunemente detta cellula bersaglio. I linfociti $CD8^+$ naïve riconoscono gli antigeni, ma devono proliferare e differenziarsi per generare una popolazione abbastanza ampia di CTL in grado di eliminare la fonte dell'antigene. All'interno del citoplasma dei CTL differenziati si trovano numerosi lisosomi modificati (chiamati granuli) che contengono proteine, tra cui perforina e granzimi, la cui funzione è uccidere altre cellule (come verrà descritto più avanti). Inoltre, i CTL differenziati sono in grado di secernere citochine, principalmente IFN-γ, la cui funzione è attivare i fagociti.

Gli eventi molecolari coinvolti nella differenziazione dei CTL comprendono la trascrizione di geni che codificano per queste molecole effettrici. Due fattori di trascrizione necessari per questa espressione genica sono T-bet (di cui si è parlato in rapporto alla differenziazione dei linfociti T_H1 al Cap. 10) e l'eomesodermina, che è strutturalmente correlata a T-bet.

T-bet e eomesodermina contribuiscono all'espressione di perforina, granzimi e alcune citochine, specialmente l'interferone γ.

Natura dell'antigene e delle cellule che presentano l'antigene per l'attivazione dei linfociti T $CD8^+$

L'attivazione dei linfociti T $CD8^+$ naïve, come quella di tutti i linfociti T naïve, viene avviata da antigeni presentati dalle cellule dendritiche. Il problema sollevato da questo requisito è che gli antigeni riconosciuti dai linfociti T $CD8^+$ possono essere virus che infettano molti tipi di cellule, incluse cellule diverse da quelle dendritiche, o possono essere antigeni di tumori anch'essi derivati da svariati tipi di cellule. La via di presentazione dell'antigene in MHC di classe I ai linfociti T $CD8^+$ richiede la presenza di antigeni proteici nel citosol delle cellule infettate in modo che tali proteine possano essere degradate dal proteasoma e possano quindi entrare nel reticolo endoplasmatico attraverso il trasportatore TAP. Le proteine di un virus che infetta un tipo specifico di cellule, per esempio le cellule epatiche, possono accedere al citosol e ai proteasomi di queste cellule, ma questo non può avvenire nelle cellule che presentano l'antigene (APC) semplicemente perché questo virus non è in grado di infettarle e quindi le cellule non possono sintetizzare l'antigene virale. Come discusso nel Capitolo 6, il sistema immunitario risolve questo problema attraverso il processo della presentazione crociata *(cross-presentation)*. In questo processo, cellule dendritiche specializzate ingeriscono cellule infettate, cellule tumorali o proteine espresse da queste cellule, trasferiscono gli antigeni proteici nel citosol ed elaborano questi antigeni in modo che entrino nella via di presentazione dell'antigene del MHC di classe I per il riconoscimento dei linfociti T $CD8^+$. Solo alcuni sottogruppi di cellule dendritiche eseguono efficacemente la presentazione crociata e sono quindi fondamentali per l'attivazione dei linfociti T $CD8^+$ naïve. Risultati di esperimenti nel topo suggeriscono che le APC più efficienti per la presentazione crociata siano le cellule dendritiche del tessuto linfoide che esprimono CD8 o il sottogruppo del tessuto periferico che esprime l'integrina CD103 (vedi Cap. 6). Nell'uomo le cellule dendritiche specializzate per la presentazione crociata esprimono livelli elevati di CD141, noto anche come BDCA-3. Inoltre, anche le cellule dendritiche plasmacitoidi possono effettuare la

presentazione crociata di proteine virali presenti nel sangue a linfociti T $CD8^+$ naïve nella milza.

Oltre a presentare antigeni sotto forma di complessi peptide-MHC, le cellule dendritiche probabilmente forniscono anche la costimolazione attraverso B7 o altre molecole (vedi Cap. 9).

Ruolo dei linfociti T helper

L'attivazione completa dei linfociti $CD8^+$naïve e la loro differenziazione in CTL funzionali e linfociti della memoria può necessitare della partecipazione dei linfociti T $CD4^+$ helper. In altre parole, i linfociti T helper possono fornire secondi segnali per i linfociti T $CD8^+$. I linfociti T helper sono attivati dall'antigene presentato su molecole MHC di classe II e da molecole costimolatorie B7 espresse dalle cellule dendritiche.

La necessità di cellule helper può variare in base al tipo di esposizione all'antigene. In caso di forte risposta immunitaria innata a un microbo, o se le APC sono direttamente infettate dal microbo, l'aiuto del linfocita T $CD4^+$ potrebbe non essere fondamentale. I linfociti T $CD4^+$ helper possono essere necessari per le risposte dei linfociti T $CD8^+$ a infezioni virali latenti, trapianti d'organo e tumori, condizioni in cui si osserva una debole stimolazione dell'immunità innata. La diversa importanza del contributo dei linfociti T $CD4^+$ nello sviluppo delle risposte dei CTL è illustrata da studi condotti con topi privi di linfociti T helper. In questi topi, alcune infezioni virali non sono in grado di generare CTL o linfociti $CD8^+$ della memoria efficaci e non vengono quindi eradicate, mentre altre stimolano risposte efficaci dei CTL. La mancanza di linfociti T $CD4^+$ e quindi una ridotta funzione helper, spiega il difetto di generazione di CTL in soggetti infettati da HIV, virus che infetta ed elimina selettivamente i linfociti T $CD4^+$. Vi sono anche prove che i linfociti T helper $CD4^+$ siano più importanti per la generazione di linfociti T $CD8^+$ della memoria che per la differenziazione di linfociti T $CD8^+$ in CTL effettori.

I linfociti T helper possono promuovere l'attivazione dei linfociti T CD8+ attraverso svariati meccanismi (Fig. 11-2).

FIGURA 11-2 Ruolo dei linfociti T helper nella differenziazione dei linfociti T CD8$^+$. I linfociti T CD4$^+$ helper promuovono lo sviluppo dei CTL CD8+ e dei linfociti della memoria secernendo citochine che agiscono direttamente sui linfociti CD8$^+$ (**A**) o aumentando l'efficacia delle APC nella stimolazione della differenziazione dei linfociti T CD8$^+$ (**B**).

- I linfociti T helper possono secernere citochine che stimolano la differenziazione dei linfociti T CD8$^+$. La natura di queste citochine è discussa al paragrafo seguente.

- I linfociti T helper attivati esprimono il ligando del CD40 (CD40L) che può legarsi al CD40 espresso dalle cellule dendritiche che presentano l'antigene. Questa interazione attiva le APC e le rende più efficienti per la differenziazione dei linfociti T CD8$^+$, in parte inducendo l'espressione di molecole costimolatorie. Questo processo viene definito *licensing* delle APC.

Ruolo delle citochine

Diverse citochine contribuiscono alla differenziazione dei linfociti T CD8$^+$ e al mantenimento dei linfociti effettori e della memoria di questa linea cellulare.

- L'IL-2 promuove la proliferazione e la differenziazione dei linfociti T CD8$^+$ in CTL e linfociti della memoria. I linfociti CD8$^+$ esprimono le catene β e γ del recettore per l'IL-2 e possono esprimere livelli elevati della catena α dopo l'attivazione (vedi Cap. 9).

- L'IL-12 e gli IFN di tipo I stimolano la differenziazione dei linfociti T CD8$^+$ naïve in CTL effettori. Queste citochine possono essere prodotte da diverse popolazioni di cellule dendritiche durante la risposta immunitaria innata a infezioni virali e alcune infezioni batteriche.

Queste stesse citochine sono coinvolte anche nella differenziazione dei linfociti T $CD4^+$ in linfociti T_H1. Questa somiglianza può indicare che lo sviluppo di entrambe le popolazioni di effettori, T_H1 e CTL, dipende da fattori di trascrizione simili, come T-bet (per entrambi) e eomesodermina (per i CTL).

- L'IL-15 è importante per la sopravvivenza dei linfociti $CD8^+$ della memoria e può essere prodotta da molti tipi cellulari, incluse le cellule dendritiche. I topi privi di IL-15 mostrano una significativa perdita di linfociti T $CD8^+$ della memoria.

- L'IL-21 prodotta dai linfociti T $CD4^+$ attivati svolge un ruolo nella generazione dei linfociti T $CD8^+$ della memoria e nella prevenzione dell'esaurimento funzionale dei linfociti T $CD8^+$ (discusso al paragrafo seguente).

Inibizione delle risposte dei linfociti T $CD8^+$: il concetto di esaurimento funzionale dei linfociti T

In alcune infezioni virali croniche, le risposte dei linfociti T $CD8^+$ possono essere stimolate ma gradualmente smorzate, un fenomeno detto di esaurimento funzionale (Fig. 11-3). Il termine *esaurimento funzionale* è stato usato per indicare che la risposta effettrice si sviluppa ma viene anche attivamente spenta (a differenza della *tolleranza*, in cui i linfociti solitamente non si sviluppano in cellule effettrici). Questo fenomeno di esaurimento funzionale è stato descritto per la prima volta in un modello di infezione virale cronica nel topo, dove è stato associato alla persistenza prolungata del virus. I linfociti T $CD8^+$ "esauriti" mostrano numerose alterazioni funzionali e fenotipiche, tra cui una ridotta produzione di IFN-γ e una maggiore espressione di diversi recettori inibitori, principalmente PD-1 (vedi Cap. 9). Un meccanismo documentato di interruzione della risposta è rappresentato da segnali inibitori provenienti da PD-1, che bloccano l'attivazione dei CTL. Il fenomeno di esaurimento funzionale dei linfociti T mediato da PD-1 può contribuire alla cronicità di alcune infezioni virali nell'uomo, quali HIV e virus dell'epatite C (HCV), e alla

capacità di alcuni tumori di eludere la risposta immunitaria (vedi Cap. 18). Gli anticorpi che bloccano PD-1 sono efficaci nell'immunoterapia dei tumori e sono attualmente studiati nelle infezioni virali croniche. L'esaurimento funzionale può essersi evoluto come metodo per attenuare il danneggiamento del tessuto conseguente alle infezioni virali croniche.

FIGURA 11-3 Esaurimento funzionale dei linfociti T. Nelle infezioni acute, i linfociti T CD8+ si differenziano in CTL che eliminano le cellule infettate. In situazioni di esposizione persistente o cronica all'antigene, la risposta dei linfociti T CD8+ è soppressa dall'espressione e dal coinvolgimento di PD-1 e di altri recettori inibitori.

FUNZIONI EFFETTRICI DEI LINFOCITI T CD8$^+$ CITOTOSSICI

I CTL CD8$^+$ eliminano i microbi intracellulari principalmente uccidendo le cellule infettate (vedi Fig. 10-1, *B*). Oltre a uccidere direttamente le cellule, i linfociti T CD8$^+$ secernono IFN-γ e quindi contribuiscono all'attivazione classica dei macrofagi nella difesa dell'ospite e nelle reazioni di ipersensibilità. Qui tratteremo i meccanismi attraverso i quali i CTL differenziati uccidono le cellule che albergano microbi.

Meccanismi della citotossicità mediata da CTL

L'uccisione mediata dai CTL prevede il riconoscimento specifico delle cellule bersaglio e il rilascio di proteine che inducono la morte cellulare. I CTL uccidono le cellule bersaglio che esprimono, associato a MHC di classe I, lo stesso antigene che ha stimolato la proliferazione e la differenziazione dei linfociti T CD8$^+$ naïve dai quali derivano e non uccidono le cellule adiacenti non infettate che non esprimono quel determinato antigene. I CTL stessi non vengono danneggiati durante l'uccisione delle cellule bersaglio. Questa specificità della funzione effettrice dei CTL assicura che le cellule normali non vengano danneggiate dai CTL che reagiscono contro le cellule infettate. L'uccisione è altamente specifica grazie alla formazione di una zona di stretto contatto cellulare,

nota come **sinapsi** (vedi Cap. 7), tra il CTL e la cellula bersaglio che esprime l'antigene. Le molecole responsabili dell'uccisione sono secrete nello spazio sinaptico e non riescono a diffondere alle cellule vicine.

Il processo di uccisione dei CTL consiste in: 1) riconoscimento dell'antigene; 2) attivazione del CTL; 3) rilascio del **colpo letale** che porta all'uccisione della cellula bersaglio; 4) distacco del CTL dalla cellula bersaglio (Fig. 11-4). Ognuno di questi passaggi è controllato da interazioni molecolari specifiche.

FIGURA 11-4 Fasi dell'uccisione della cellula bersaglio da parte dei CTL. Un CTL viene attivato dal riconoscimento della cellula bersaglio che esprime l'antigene. L'attivazione determina il rilascio direzionato del contenuto dei granuli del CTL verso la zona di contatto con la cellula bersaglio (sinapsi immunologica). Il contenuto dei granuli sferra uncolpo letale alla cellula bersaglio. Il CTL può staccarsi e uccidere altre cellule bersaglio. La formazione di coniugati tra un CTL e il suo bersaglio e l'attivazione del CTL richiedono interazioni tra le molecole accessorie espresse dal CTL (LFA-1 e CD8) e i loro ligandi specifici (rispettivamente ICAM-1 e MHC di classe I) espressi dalla cellula bersaglio (non mostrata in figura).

Riconoscimento dell'antigene e attivazione dei CTL

Il CTL si lega e reagisce contro la cellula bersaglio usando il proprio recettore, il corecettore (CD8) e le molecole di adesione. Per essere riconosciute efficacemente dai CTL, le cellule bersaglio devono esprimere molecole MHC di classe I complessate con un peptide (il complesso serve come ligando per il recettore dell'antigene dei linfociti [TCR] e si lega anche al corecettore CD8) e la molecola di adesione intercellulare 1 (ICAM-1, il principale ligando per l'integrina LFA-1). I CTL in questo modo si associano ai propri bersagli cellulari in modo molto stabile (Fig. 11-5). Questa sinapsi immunologica (vedi Cap. 7) formata tra le due cellule è caratterizzata da un anello definito da uno stretto accostamento tra la membrana del CTL e la membrana della cellula bersaglio, formato dal legame di LFA-1 a ICAM-1, e da uno spazio racchiuso all'interno

dell'anello. Con la microscopia a immunofluorescenza si possono osservare regioni distinte della membrana del CTL all'interno dell'anello, tra cui una zona deputata alla trasduzione del segnale, che include il TCR, la proteina chinasi C-θ, Lck e un dominio secretorio che è costituito dalla regione a lato del dominio secretorio. Questa interazione determina l'avvio di segnali biochimici che attivano il CTL, che sono essenzialmente gli stessi coinvolti nell'attivazione dei linfociti T helper. Le citochine e le molecole costimolatorie espresse dalle cellule dendritiche, necessarie per la differenziazione dei linfociti T $CD8^+$ naïve in CTL, non sono richiesti per stimolare la funzione effettrice dei CTL (cioè per l'uccisione delle cellule bersaglio). Quindi, una volta che i linfociti T $CD8^+$ si sono differenziati in CTL pienamente funzionali, possono uccidere qualsiasi cellula nucleata che presenti l'antigene per cui sono specifici.

FIGURA 11-5 Formazione di coniugati tra i CTL e una cellula bersaglio. A. Fotografia al microscopio elettronico di tre CTL di una cellula clonale specifica per la molecola MHC umana HLA-A2 che si legano a una cellula bersaglio (TC) che esprime HLA-A2 subito dopo essere stati messi in contatto (1 minuto). Si osservi che nel CTL in alto a sinistra, i granuli si sono ridistribuiti verso la TC. **B.** Fotografia al microscopio elettronico del punto di contatto delle membrane di un CTL (*a sinistra*) e di una cellula bersaglio (*a destra*). Due granuli del CTL sono vicini alla sinapsi. Sono visibili anche numerosi mitocondri. **C.** Fotografia al microscopio confocale a fluorescenza di una sinapsi immunologica tra un CTL (*a sinistra*) e una cellula bersaglio (*a destra*). È stata effettuata una colorazione con anticorpi diretti contro le catepsine presenti in un granulo secretorio (*blu*), LFA-1 (*verde*) e la proteina del citoscheletro talina (*rosso*). L'immagine mostra la localizzazione centrale del granulo secretorio e quella periferica della molecola di adesione LFA-1 che si associa al citoscheletro attraverso la talina. (***A,*** *Per gentile concessione del Dr. P. Peters, Netherlands Cancer Institute, Amsterdam.* ***B,*** *Da Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, Griffiths GM: The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges, Immunity 8:751-761, 2001. Copyright © Cell Press, per gentile concessione di Elsevier.* ***C,*** *Da Stinchcombe JC, Griffiths GM: The role of the secretory immunological synapse in killing by $CD8^+$ CTL, Seminars in Immunology 15:301-205.*

Copyright © 2003 Elsevier Science Ltd., per gentile concessione di Elsevier.)

Oltre al recettore dei linfociti T, i CTL $CD8^+$ esprimono recettori che sono espressi anche dalle cellule NK e che contribuiscono alla regolazione e all'attivazione dei CTL. Alcuni di questi appartengono alla famiglia dei KIR (*Killer Immunoglobulin Receptor*), discussi nel Capitolo 4, e riconoscono le molecole MHC di classe I sulle cellule bersaglio, pur non essendo specifici per un determinato complesso peptide-MHC. Questi KIR trasducono segnali inibitori che servono a impedire che i CTL uccidano cellule normali. I CTL, inoltre, esprimono il recettore NKG2D, descritto nel Capitolo 4, che riconosce le molecole MIC-A, MIC-B e ULBP, proteine simili a MHC di classe I, espresse su cellule danneggiate (infettate o trasformate). L'NKG2D può servire a trasmettere segnali che, insieme al riconoscimento dell'antigene da parte del TCR, promuovono l'uccisione della cellula bersaglio.

Uccisione delle cellule bersaglio da parte dei CTL

Pochi minuti dopo aver riconosciuto l'antigene su una cellula bersaglio attraverso il proprio TCR, il CTL rilascia le proteine dei granuli verso la cellula bersaglio, causandone la morte per apoptosi. La morte della cellula bersaglio ha luogo nelle 2-6 ore successive al riconoscimento dell'antigene e avviene anche se il CTL si distacca. Si dice quindi che il CTL sferri un colpo mortale alla cellula bersaglio. Il principale meccanismo di uccisione del CTL è il rilascio di proteine citotossiche immagazzinate all'interno dei granuli citoplasmatici (detti anche lisosomi secretori), queste proteine stimolano l'apoptosi della cellula bersaglio (Fig. 11-6). Come discusso in precedenza, il riconoscimento della cellula bersaglio da parte del CTL porta all'attivazione e alla riorganizzazione del citoscheletro del CTL stesso. In questo processo, il centro di organizzazione dei microtubuli del CTL si sposta verso l'area del citoplasma che si trova vicino al punto di contatto con la cellula bersaglio. I granuli citoplasmatici vengono trasportati lungo i microtubuli e si concentrano nella regione della sinapsi, qui la membrana dei granuli si fonde con quella plasmatica nel dominio secretorio. La fusione delle

membrane causa l'esocitosi dei granuli all'interno dell'anello sinaptico formatosi tra le membrane plasmatiche del CTL e la cellula bersaglio.

FIGURA 11-6 Meccanismi di uccisione delle cellule bersaglio da parte del CTL. I CTL uccidono le cellule bersaglio attraverso due meccanismi principali. **A.** Complessi di perforina e granzimi vengono rilasciati dal CTL tramite esocitosi dei granuli e penetrano nelle cellule bersaglio. I granzimi sono introdotti nel citoplasma delle cellule bersaglio attraverso un meccanismo perforina-dipendente inducono l'apoptosi. **B.** FasL espresso dai CTL attivati lega Fas sulla superficie della cellula bersaglio inducendono l'apoptosi.

Le principali proteine citotossiche contenute nei granuli dei CTL (e delle cellule NK) sono i granzimi e la perforina. I **granzimi** A, B e C sono serina proteasi che condividono una sequenza His-Asp-Ser nei loro domini catalitici. Il granzima B taglia le proteine dopo i residui di aspartato ed è l'unico componente dei granuli responsabile della citotossicità dei CTL *in vivo* attraverso l'attivazione delle caspasi che inducono alla morte cellulare (le caspasi effettrici). La **perforina** è una molecola, omologa alla proteina C9 del complemento, che altera la membrana. I granuli contengono anche un proteoglicano solforato, la **serglicina**, che serve ad assemblare un complesso contenente granzimi e perforina.

La principale funzione della perforina è facilitare il rilascio dei granzimi nel citosol della cellula bersaglio, ma non si sa ancora attraverso quale meccanismo. La perforina può polimerizzare e formare pori acquosi nella membrana della cellula bersaglio, ma la dimensione di questi pori potrebbe non essere sufficiente a permettere ai granzimi di entrare. Secondo l'ipotesi corrente, i complessi di granzima B, perforina e serglicina sono rilasciati dal CTL sulla cellula bersaglio e l'inserimento della perforina nella sua membrana stimola un processo di riparazione della membrana stessa, che porta all'internalizzazione negli endosomi sia della perforina che dei granzimi. La perforina può quindi agire sulla membrana endosomiale e facilitare il rilascio dei granzimi nel citosol della cellula bersaglio. Una volta nel citosol, i granzimi scindono vari substrati, tra cui le caspasi, e avviano la morte della cellula per apoptosi. Per esempio, il granzima B

attiva la caspasi-3 e il membro della famiglia Bcl-2 Bid, che stimola la via mitocondriale dell'apoptosi (vedi Fig. 15-8). Un'altra proteina presente nei granuli dei CTL (e delle cellule NK) umani, chiamata granulisina, può alterare la permeabilità della membrana della cellula bersaglio e del microbo, ma non si conosce al momento la sua importanza nell'uccisione da parte dei CTL.

I CTL usano anche un meccanismo di uccisione indipendente dai granuli, mediato da interazioni tra le molecole di membrana presenti sui CTL e sulle cellule bersaglio. I CTL attivati esprimono una proteina di membrana chiamata **ligando del Fas (FasL)** che si lega al recettore di morte Fas, espresso da molti tipi cellulari. Anche questa interazione causa l'attivazione di caspasi e innesca l'apoptosi delle cellule bersaglio che esprimono Fas (vedi Fig. 15-8). Studi condotti su topi knockout privi di perforina, granzima B o FasL indicano che la perforina e il granzima B sono i principali mediatori dei meccanismi citotossici dei CTL $CD8^+$. Alcuni linfociti T $CD4^+$ presenti nell'intestino e spesso indotti dalle infezioni virali esprimono la perforina e i granzimi e sono in grado di uccidere le cellule bersaglio (che ovviamente per essere riconosciute dai linfociti $CD4^+$ devono esprimere antigeni associati a MHC di classe II).

Dopo aver sferrato il colpo letale, il CTL si allontana dalla sua cellula bersaglio, solitamente ancora prima che la cellula inizi a morire. I CTL stessi non vengono danneggiati durante l'uccisione della cellula bersaglio, probabilmente perché il processo di esocitosi dei granuli rilascia il contenuto preferenzialmente in direzione della cellula bersaglio, lontano dal CTL. Inoltre, i granuli del CTL contengono un enzima proteolitico chiamato catepsina B che viene rilasciato sulla superficie del CTL durante l'esocitosi dei granuli, dove degrada le molecole di perforina che si trovano nelle vicinanze della membrana del CTL.

Produzione di citochine da parte dei linfociti T $CD8^+$ effettori

I linfociti T $CD8^+$ producono IFN-γ, una citochina importante per l'attivazione dei macrofagi. La secrezione di IFN-γ in risposta a specifici antigeni peptidici è infatti un saggio sensibile per definire la frequenza di

linfociti T $CD8^+$ specifici per un determinato antigene in una popolazione di linfociti. La produzione di questa citochina costituisce un'altra somiglianza tra i linfociti T $CD8^+$ e i linfociti T_H1. È probabile che entrambe queste classi di linfociti T contribuiscano all'eliminazione dei microbi da parte delle cellule fagocitiche attivate da IFN-γ. I linfociti T $CD8^+$ possono anche essere coinvolti in alcune reazioni infiammatorie provocate da citochine. Un esempio sono le reazioni cutanee di ipersensibilità da contatto causate da sostanze chimiche ambientali, in questo caso i linfociti T $CD8^+$, che producono IFN-γ, vengono reclutati a livello tissutale in numero maggiore e più velocemente dei linfociti T $CD4^+$.

RUOLO DEI CTL $CD8^+$ NELLA DIFESA DELL'OSPITE

Nelle infezioni dovute a microbi intracellulari, l'uccisione da parte dei CTL è importante per l'eradicazione del serbatoio di infezione (vedi Fig. 10-1, *B*). Ciò è particolarmente importante in due tipi di situazioni in cui le cellule sono incapaci di eliminare i microbi che le hanno infettate. Innanzitutto, la maggior parte dei virus vive e si replica in cellule prive della capacità di eliminare i microbi attraverso i fagosomi/lisosomi (come il virus dell'epatite nelle cellule epatiche). Secondo, anche nei fagociti, alcuni microbi fuoriescono dal fagolisosoma e vivono nel citosol dove i meccanismi microbicidi, che sono normalmente limitati ai fagolisosomi (per proteggere le cellule da eventuali danni) sono inefficaci. Queste infezioni possono essere eradicate solo eliminando le cellule infettate e tramite le risposte adattative; i CTL $CD8^+$ rappresentano il principale meccanismo per uccidere tali cellule (vedi Fig. 16-4). Inoltre, le caspasi, che vengono attivate nelle cellule bersaglio dai granzimi e da FasL, scindono molti substrati e attivano enzimi che degradano il DNA senza discriminare tra proteine dell'ospite e proteine microbiche. Attivando le nucleasi nelle cellule bersaglio, i CTL possono quindi avviare contemporaneamente alla degradazione del genoma della cellula bersaglio, la degradazione del DNA microbico, eliminando così il DNA potenzialmente infettivo. La massiccia espansione dei linfociti T $CD8^+$ che segue alle infezioni (vedi Fig. 9-12) fornisce un ampia popolazione di CTL

in grado di combattere queste infezioni. In caso di mancata espansione e attivazione della risposta CTL si osserva un aumento della suscettibilità alle infezioni virali, ad alcune infezioni batteriche e la riattivazione di infezioni virali latenti (come l'infezione da parte del virus di Epstein-Barr) che sono normalmente tenute sotto controllo da CTL specifici.

Oltre a svolgere un ruolo nell'eliminazione delle cellule infettate da virus, i CTL sono fondamentali per la difesa dell'ospite contro determinati batteri intracellulari, incluso il *Mycobacterium tuberculosis*, e nell'eliminazione di un certo numero di altri organismi tra cui il protozoo parassita che causa la malaria (vedi Cap. 16).

L'uccisione delle cellule infettate da parte dei CTL causa danno tissutale in alcune malattie infettive. Per esempio, nell'infezione da parte dei virus dell'epatite B e C, le cellule epatiche infettate sono uccise dalla risposta dei CTL (e delle cellule NK) dell'ospite e non dal virus. Questi virus non sono citopatici ma l'ospite, reagendo contro l'agente infettivo, non è in grado di distinguere i microbi intrinsecamente nocivi da quelli relativamente innocui (vedi Cap. 19).

I CTL sono importanti mediatori dell'immunità tumorale e del rigetto dei trapianti d'organo. Queste funzioni dei CTL saranno descritte nei capitoli successivi.

RIEPILOGO

- * I linfociti T $CD8^+$ proliferano e si differenziano in linfociti T citotossici (CTL), che esprimono granuli citotossici e possono uccidere le cellule infettate.
- * La differenziazione dei linfociti T $CD8^+$ in CTL funzionali e in linfociti della memoria richiede il riconoscimento dell'antigene presentato dalle cellule dendritiche e, in alcune situazioni, i segnali dei linfociti T $CD4^+$ helper, la costimolazione e la presenza di citochine. La differenziazione dei CTL prevede l'acquisizione dei meccanismi necessari per uccidere le cellule bersaglio ed è guidata da vari fattori di trascrizione.

- * In alcune situazioni di esposizione cronica all’antigene (come i tumori e le infezioni virali croniche), i linfociti T $CD8^+$ avviano una risposta ma iniziano poi a esprimere recettori inibitori che sopprimono la risposta stessa, un processo chiamato esaurimento funzionale.
- * I CTL $CD8^+$ uccidono le cellule che esprimono, complessi molecole MHC di classe I:peptidi derivati dagli antigeni del citosol (per esempio gli antigeni virali). L’uccisione da parte dei CTL avviene principalmente mediante l’esocitosi dei granuli, che contengono granzimi e perforina. La perforina facilita l’ingresso dei granzimi nel citoplasma delle cellule bersaglio e i granzimi avviano diverse vie dell’apoptosi.
- * I linfociti T $CD8^+$ secernono anche IFN-γ e quindi possono partecipare alla difesa contro i microbi fagocitati nelle reazioni di ipersensibilità ritardata.

LETTURE CONSIGLIATE

Attivazione dei linfociti T $CD8^+$

Castellino F.; Germain R.N: Cooperation between $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells: when, where, and how. *Annual Review of Immunology* 24:519–540 (2006).

Kaech S.M.; Cui W: Transcriptional control of effector and memory $CD8^+$ T cell differentiation. *Nature Reviews Immunology* 12:749–761 (2012).

Masopust D.; Vezys V.; Wherry E.J.; Ahmed R: A brief history of $CD8^+$ T cells. *European Journal of Immunology* 37:S103–S110 (2007).

Wherry E.J: T cell exhaustion. *Nature Immunology* 12:492–499 (2011).

Williams M.A.; Bevan M.J: Effector and memory CTL differentiation. *Annual Review of Immunology* 25:171–192 (2007).

Zhang N.; Bevan M.J: $CD8^+$ T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* 35:161–168 (2011).

Funzioni dei linfociti T citotossici

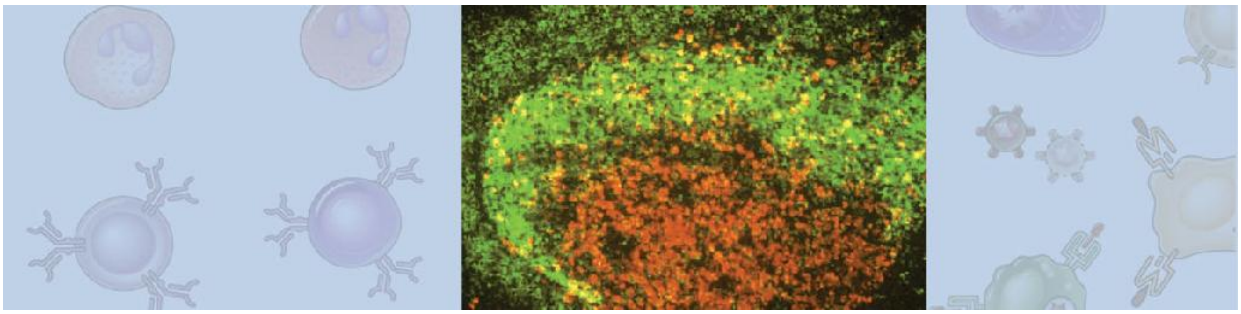
Bossi G.; Griffiths G.M: CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle. *Seminars in Immunology* 17:87–94 (2005).

Lieberman J: The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature Reviews Immunology* 3:361–370 (2003).

Wong P.; Pamer E.G: CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annual Review of Immunology* 21:29–70 (2003).

CAPITOLO

12



Attivazione dei linfociti B e produzione di anticorpi

CARATTERISTICHE GENERALI DELLE RISPOSTE IMMUNITARIE UMORALI

RICONOSCIMENTO DELL'ANTIGENE E ATTIVAZIONE DEI LINFOCITI B

- Cattura e localizzazione dell'antigene per il riconoscimento da parte dei linfociti B
- Attivazione dei linfociti B da parte degli antigeni e di altri stimoli
- Attivazione dei linfociti B in seguito al riconoscimento dell'antigene

RISPOSTE ANTICORPALI AGLI ANTIGENI PROTEICI CHE DIPENDONO DAI LINFOCITI T HELPER

- Eventi che caratterizzano le risposte anticorpali agli antigeni T-dipendenti
- Attivazione iniziale e migrazione dei linfociti B e dei linfociti T helper
- Presentazione dell'antigene da parte dei linfociti B ed effetto aptene-carrier
- Ruolo dell'interazione CD40L:CD40 nell'attivazione dei linfociti B da parte di antigeni T-dipendenti
- Attivazione extrafollicolare dei linfociti B
- Reazione del centro germinativo
- Induzione dei linfociti follicolari T helper
- Scambio di classe (isotipico) della catena pesante
- Maturazione dell'affinità anticorpale: mutazioni somatiche a carico dei geni che codificano per le Ig e selezione dei linfociti B ad alta affinità
- Differenziazione dei linfociti B in plasmacellule secernenti anticorpi
- Generazione di linfociti B della memoria
- Ruolo dei fattori di trascrizione nell'attivazione dei linfociti B

RISPOSTE ANTICORPORALI AGLI ANTIGENI T-INDIPENDENTI

- Tipi di linfociti B che rispondono agli antigeni T-indipendenti
- Meccanismi delle risposte T-indipendenti
- Protezione mediata da anticorpi T-indipendenti

FEEDBACK ANTICORPORALE: REGOLAZIONE DELLE RISPOSTE IMMUNITARIE UMORALI DA PARTE DEI RECETTORI Fc

RIEPILOGO

L'immunità umorale utilizza gli anticorpi prodotti dai linfociti B. In questo capitolo descriveremo gli eventi molecolari e cellulari che caratterizzano le risposte immunitarie umorali, con particolare attenzione agli stimoli che promuovono la crescita e la differenziazione dei linfociti B e ai meccanismi

attraverso i quali tali stimoli influenzano il tipo di anticorpi prodotti. I meccanismi attraverso cui gli anticorpi eliminano i microbi saranno descritti nel Capitolo 13.

CARATTERISTICHE GENERALI DELLE RISPOSTE IMMUNITARIE UMORALI

I primi studi sull'immunità specifica furono finalizzati all'analisi degli anticorpi sierici prodotti in risposta a microrganismi, a tossine o ad alcuni antigeni prototipici. È proprio da tali studi che deriva la maggior parte delle nostre attuali conoscenze sulle risposte immunitarie acquisite e sulle interazioni cellulari che si verificano durante tali risposte. Cominciamo riassumendo alcune delle caratteristiche cruciali dei meccanismi di attivazione dei linfociti B e della produzione anticorpale.

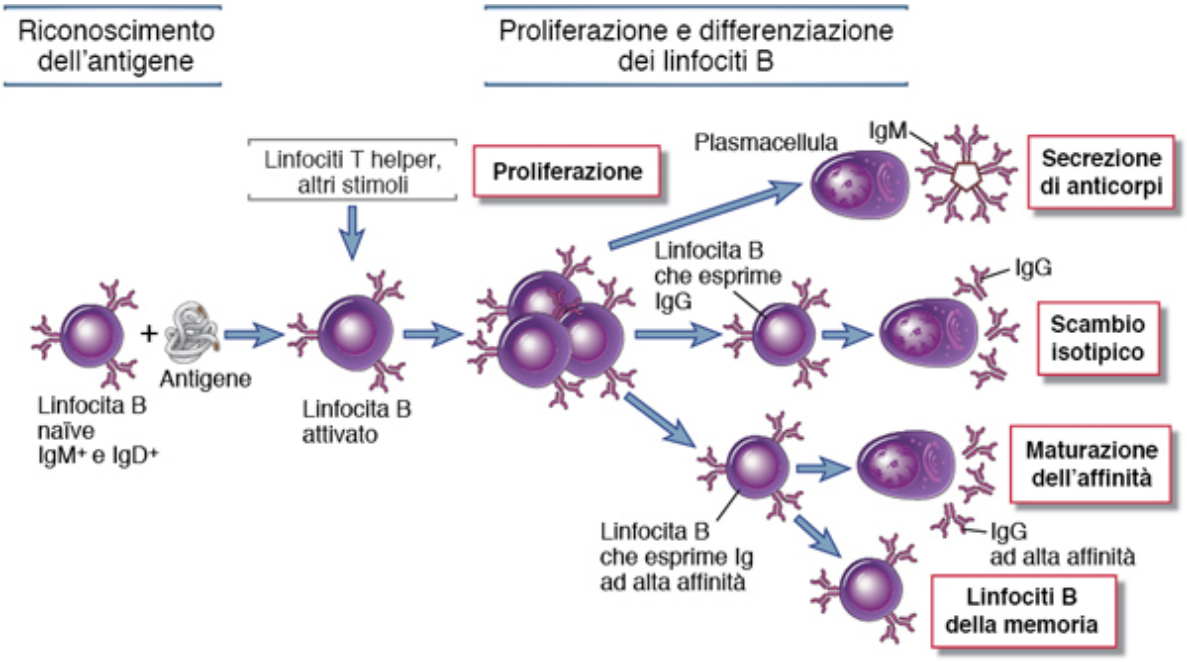


FIGURA 12-1 Fasi della risposta immunitaria umorale. L'attivazione dei linfociti B è innescata dal riconoscimento specifico dell'antigene da parte delle immunoglobuline (Ig) di membrana espresse sulla superficie dei linfociti B. L'antigene e altri stimoli, come i linfociti T helper, stimolano la proliferazione e la differenziazione del clone di linfociti B specifico per l'antigene. La progenie del clone può differenziarsi in plasmacellule che producono IgM o altre classi di anticorpi (per esempio IgG), può andare incontro al processo di maturazione dell'affinità o differenziarsi in linfocita B della memoria.

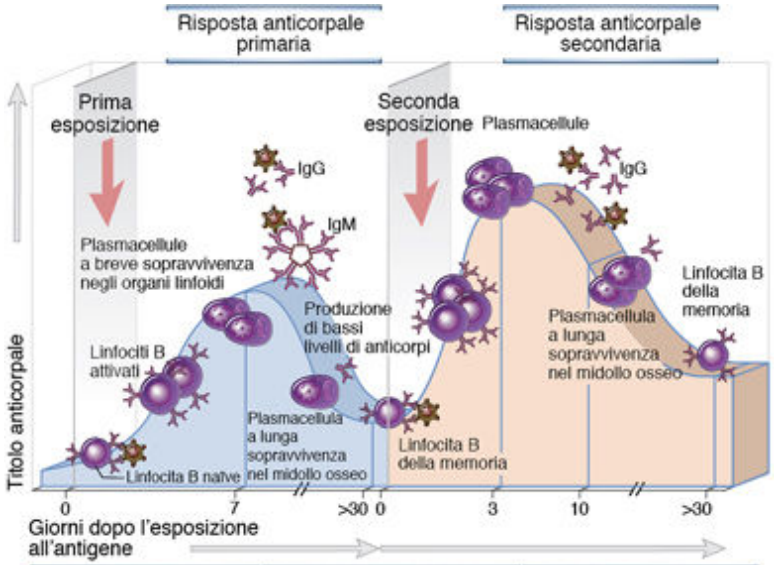
- ***L'attivazione dei linfociti B porta alla proliferazione cellulare e all'espansione clonale seguita dalla loro differenziazione che culmina con la generazione di plasmacellule secernenti anticorpi e di cellule B della memoria*** (Fig. 12-1). Come già descritto nel Capitolo 8, i linfociti B maturi, in grado di rispondere all'antigene, si sviluppano a partire da precursori midollari prima dell'incontro con l'antigene e vanno poi a localizzarsi negli organi linfoidi secondari, siti nei quali avviene preferenzialmente l'interazione con gli antigeni. Le risposte immunitarie umorali iniziano con il riconoscimento specifico di un particolare antigene da parte di linfociti B. L'antigene lega e attiva i recettori, rappresentati da immunoglobuline M (IgM) e IgD, espresse sulla membrana dei linfociti B naïve. L'attivazione porta alla proliferazione e alla differenziazione in cellule della memoria e in plasmacellule secernenti anticorpi. Un singolo linfocita B può, nell'arco di una settimana, dare origine a più di 5.000 cellule: complessivamente, ciò determina una produzione giornaliera superiore a 10^{12} molecole di anticorpo. Questa stupefacente proliferazione si rende necessaria per tenere il passo con la velocissima replicazione dei microrganismi patogeni. Alcuni dei linfociti B attivati possono iniziare a produrre anticorpi diversi dalle IgM e dalle IgD, processo definito **scambio di classe (isotipo) delle catene pesanti**. A mano a mano che la risposta umorale procede, prendono il sopravvento i linfociti B che producono anticorpi con un'affinità sempre maggiore; questo processo è definito **maturazione dell'affinità**.
- ***La classe e la quantità di anticorpi prodotti variano in base al tipo di antigene che ha avviato la risposta, al coinvolgimento dei linfociti T, alla possibilità che lo stesso antigene sia già stato incontrato dall'individuo e al sito anatomico in cui avviene il riconoscimento dell'antigene***. L'importanza di questi fattori nella risposta umorale verrà trattata con maggiore dettaglio più avanti nel corso di questo capitolo.
- ***Le risposte anticorporali verso gli antigeni proteici richiedono che l'antigene sia internalizzato da parte dei linfociti B, processato e presentato ai linfociti T helper CD4$^+$, che poi a loro volta attivano i linfociti B.*** Per questa ragione, le proteine vengono definite **antigeni T-dipendenti**. La definizione di *linfocita T helper* deriva dal fatto che tali

cellule “aiutano” i linfociti B a produrre anticorpi. Un tipo specializzato di linfociti T helper, denominati **T helper follicolari**, facilita la formazione dei centri germinativi, che sono strutture presenti all’interno degli organi linfoidi, dove hanno luogo diversi aspetti delle risposte umorali verso gli antigeni T-dipendenti.

- ***Le risposte anticorpali agli antigeni multivalenti dotati di determinanti antigenici ripetuti (come i polisaccaridi, alcuni lipidi e gli acidi nucleici) non richiedono l’intervento dei linfociti T helper***. Gli antigeni multivalenti (così chiamati perché ogni molecola contiene molteplici epitopi identici) sono quindi definiti **antigeni T-indipendenti**. In questo caso le risposte sono direttamente attivate dall’ingaggio del recettore del linfocita B (*B Cell Receptor*, BCR) e possono essere potenziate dai segnali provenienti da altri recettori espressi dai linfociti B.
- ***I linfociti B attivati si differenziano in plasmacellule che producono anticorpi.*** Nelle risposte T-dipendenti, le plasmacellule, o i loro precursori, migrano dal centro germinativo degli organi linfoidi secondari, dove sono prodotte, al midollo osseo, dove potranno sopravvivere per molti anni. Queste cellule forniscono una protezione immediata ogniqualvolta lo specifico microrganismo da esse riconosciuto infetti nuovamente l’individuo.
- ***Alcuni dei linfociti B attivati in maniera T-indipendente possono differenziarsi in cellule della memoria.*** Tali cellule sopravvivono per anni in uno stato di quiescenza senza secernere anticorpi, ma sono in grado di dare luogo a rapide risposte in seguito all’incontro con l’antigene
- ***I processi di scambio isotipico e di maturazione dell’affinità avvengono tipicamente nelle risposte T-dipendenti verso antigeni proteici***. Entrambi questi processi sono determinati dalla stimolazione dei linfociti B da parte dei linfociti T helper. I segnali dei linfociti T che guidano lo scambio isotipico e la maturazione dell’affinità, nonché i meccanismi molecolari e il significato funzionale sono discussi più avanti nel capitolo.
- ***Le risposte anticorpali primarie e secondarie verso gli antigeni proteici si differenziano a livello qualitativo e quantitativo*** (Fig. 12-2). Le risposte primarie sono il risultato dell’attivazione di linfociti B naïve

che mai in precedenza erano venuti a contatto con l'antigene. Al contrario, le risposte secondarie sono dovute alla stimolazione dei cloni di linfociti B della memoria che si erano già espansi numericamente nel corso della prima esposizione all'antigene. Le risposte secondarie si sviluppano quindi più rapidamente rispetto a quelle primarie, producendo una quantità maggiore di anticorpi. Anche i fenomeni di scambio di classe e di maturazione dell'affinità si intensificano in seguito a ripetute esposizioni agli antigeni proteici.

- ***Distinte popolazioni di linfociti B rispondono preferenzialmente a diversi tipi di antigene*** (Fig. 12-3). I linfociti B follicolari degli organi linfoidi secondari principalmente rispondono agli antigeni proteici, che richiedono la collaborazione dei linfociti T helper. I linfociti B della zona marginale della milza e degli altri organi linfoidi, riconoscono invece preferenzialmente gli antigeni multivalenti con determinanti antigenici ripetuti (per esempio i polisaccaridi del sangue) evocando una risposta anticorpale indipendente dai linfociti T. Anche i linfociti B-1 nei tessuti mucosi e nel peritoneo sono preferenzialmente coinvolti in risposte T-indipendenti.



Caratteristica	Risposta primaria	Risposta secondaria
Picco della risposta	Minore	Maggiore
Isotipo anticorpale	Abitualmente IgM > IgG	Aumento relativo delle IgG e, in determinate situazioni, delle IgA o delle IgE
Affinità anticorpale	In genere affinità minore, maggiore variabilità	In genere affinità maggiore (maturazione dell'affinità)
Indotta da	Tutti gli immunogeni	Principalmente antigeni proteici

FIGURA 12-2 Risposte immunitarie umorali primarie e secondarie. Nella risposta primaria i linfociti B naïve si attivano e si differenziano in plasmacellule che producono anticorpi specifici per l'antigene che ha innescato la risposta. La risposta immunitaria secondaria si avvia quando i linfociti B della memoria vengono nuovamente stimolati dallo stesso antigene. Ciò determina la proliferazione e la differenziazione dei linfociti B in modo più rapido e la produzione di quantità maggiori di anticorpi specifici rispetto a quelle prodotte nel corso della risposta primaria. Si noti che le principali caratteristiche delle risposte anticorpali secondarie sono riassunte nella tabella. Tali caratteristiche sono tipiche delle risposte anticorpali agli antigeni proteici dipendenti da linfociti T.

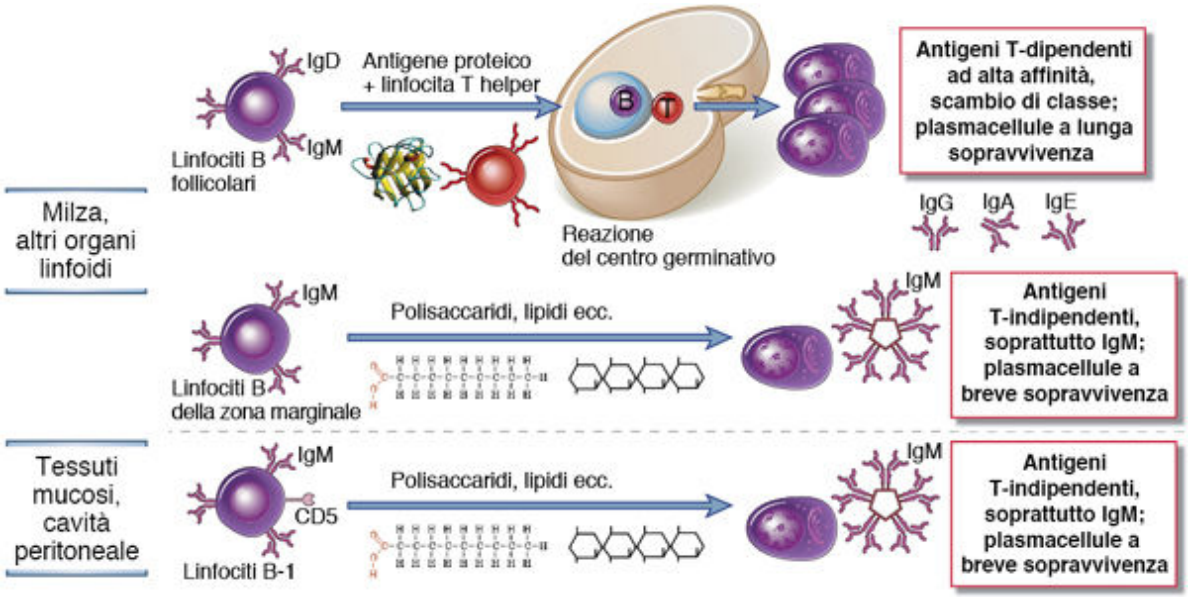


FIGURA 12-3 Diversi tipi di linfociti B attivano diverse risposte anticorpali. I linfociti B follicolari rispondono agli antigeni T-dipendenti grazie alla cooperazione con i linfociti T. Le risposte agli antigeni T-indipendenti sono messe in atto principalmente, nella milza, dai linfociti B della zona marginale e nelle mucose, dai linfociti B-1. Queste differenze funzionali tra le varie sottopopolazioni non sono assolute.

Sulla base di queste premesse, discutiamo ora dell'attivazione dei linfociti B, partendo dall'interazione con l'antigene. Descriveremo poi il ruolo dei linfociti T helper nelle risposte B agli antigeni proteici e i meccanismi attraverso i quali avvengono lo scambio di classe e la maturazione dell'affinità dell'anticorpo. Concluderemo con la discussione delle risposte agli antigeni T-indipendenti.

RICONOSCIMENTO DELL'ANTIGENE E ATTIVAZIONE DEI LINFOCITI B

L’inizio della risposta anticorpale richiede che l’antigene venga catturato e trasportato nelle aree B degli organi linfoidi. Qui l’antigene avvia il processo di attivazione del linfocita B, spesso in concerto con altri segnali generati durante la risposta innata all’infezione microbica o attivata dagli adiuvanti presenti nei vaccini. Cominceremo dagli eventi precoci del processo di attivazione dei linfociti B.

Cattura e localizzazione dell’antigene per il riconoscimento da parte dei linfociti B

La maggior parte dei linfociti B maturi è costituita dai linfociti B follicolari naïve (talvolta chiamati anche linfociti B ricircolanti) che ricircolano continuamente attraverso il sangue da un organo linfoide secondario a quello successivo alla ricerca dell’antigene. I linfociti B follicolari entrano nei tessuti linfoidi secondari (la milza, i linfonodi e i tessuti linfoidi mucosali) attraverso i vasi ematici localizzati nelle aree T, per poi migrare all’interno dei follicoli, le aree in questi tessuti dove si localizzano i linfociti B. La migrazione nel follicolo linfoide è guidata dalla chemochina CXCL13 secreta dalle cellule dendritiche follicolari, il tipo di cellule stromali prevalente nel follicolo, nonché da altre cellule stromali. CXCL13 si lega al recettore per chemochine CXCR5 espresso dai linfociti B naïve ricircolanti indirizzandoli all’interno dei follicoli. Come vedremo successivamente, la stessa coppia chemochina-recettore è importante anche durante le risposte immunitarie in quanto è in grado di attrarre verso il follicolo una specifica classe di linfociti T attivati.

Gli antigeni vengono indirizzati ai linfociti B presenti negli organi linfoidi secondari attraverso diverse vie. Gli antigeni che sono penetrati attraverso una barriera epiteliale, così come quelli presenti in circolo, sono indirizzati verso i follicoli attraverso molteplici meccanismi (Fig. 12-4).

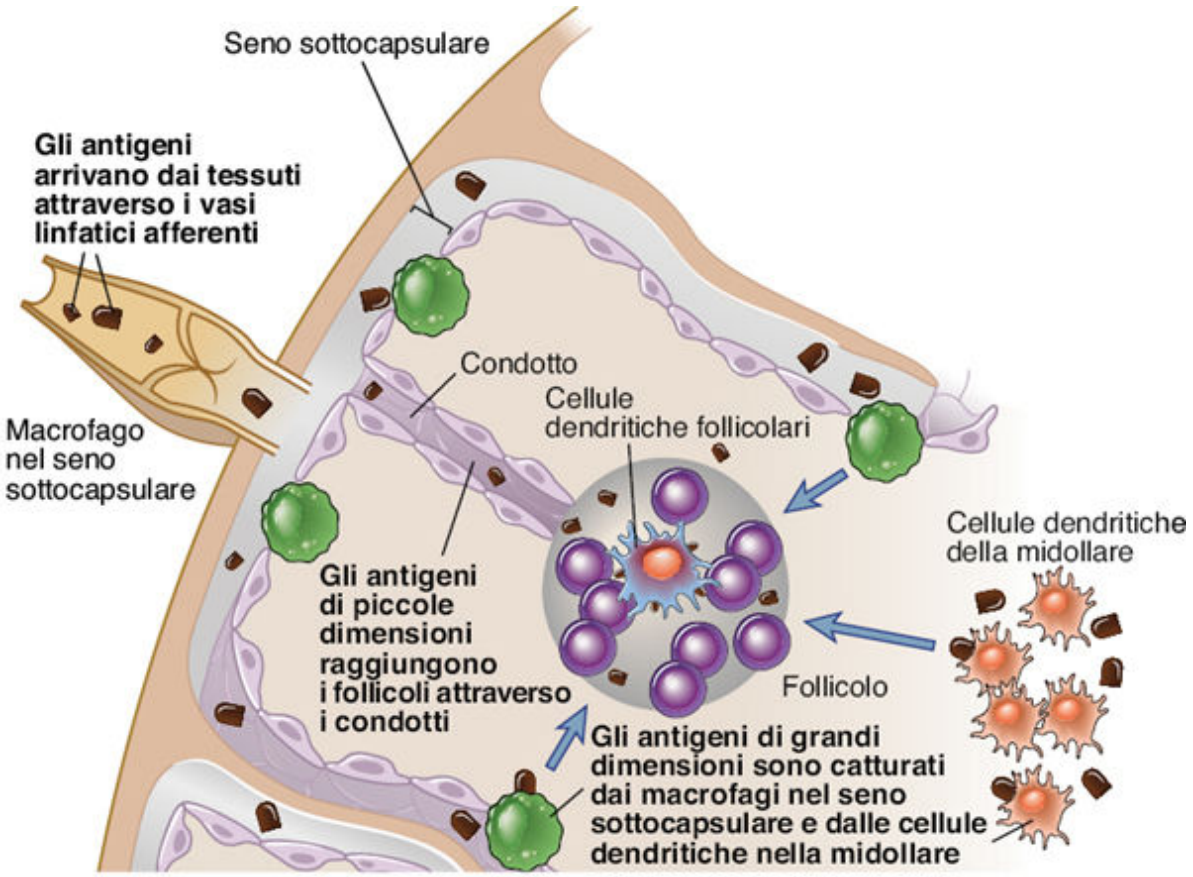


FIGURA 12-4 Vie attraverso cui gli antigeni raggiungono i linfociti B follicolari. Gli antigeni di piccole dimensioni raggiungono i linfociti B nei follicoli attraverso i vasi e i condotti linfatici, mentre gli antigeni di dimensioni maggiori vengono trasportati dai macrofagi presenti nel seno sottocapsulare, oppure tramite le cellule dendritiche presenti nella midollare.

- La maggior parte degli antigeni sono trasportati dai tessuti ai linfonodi attraverso i vasi linfatici afferenti che drenano nel seno sottocapsulare. Gli antigeni solubili, di dimensioni inferiori ai 70 kD, possono raggiungere le aree B attraverso condotti che si estendono tra il seno sottocapsulare e il follicolo e interagire direttamente con i linfociti B.
- I macrofagi del seno sottocapsulare catturano i microbi di grandi dimensioni e i complessi antigene-anticorpo e li trasferiscono nei follicoli.
- Molti degli antigeni di grandi dimensioni che entrano nel linfonodo attraverso i vasi linfatici non sono catturati dai macrofagi del seno sottocapsulare. Data la loro dimensione non riescono a entrare nei condotti reticolari e vengono catturati nella regione midollare dalle

cellule dendritiche qui residenti e trasportati ai follicoli dove possono essere riconosciuti dai linfociti B.

- Gli antigeni che fanno parte di immunocomplessi possono legare i recettori del complemento (in particolare il recettore del complemento di tipo 2, CR2) espresso dai linfociti B della zona marginale per essere trasferiti ai linfociti B follicolari.
- Gli immunocomplessi possono anche legarsi al recettore CR2 del complemento, espresso dalle cellule dendritiche follicolari, per essere poi presentati ai linfociti B.
- I patogeni presenti in circolo possono essere catturati dalle cellule dendritiche plasmacitoidi presenti nel sague e trasportati alla milza per essere veicolati ai linfociti B della zona marginale.
- Gli antigeni polisaccaridici possono essere catturati dai macrofagi della zona marginale dei follicoli linfoidi della milza e presentati o trasferiti ai linfociti B presenti in quest'area.

In tutti questi casi, ***l'antigene che è presentato ai linfociti B è generalmente integro, nella sua conformazione nativa, e non è processato dalle cellule che presentano l'antigene***. Questo fatto rappresenta una delle differenze importanti tra le forme di antigene riconosciute dai linfociti B e quelle riconosciute dai linfociti T (vedi Cap. 6).

Attivazione dei linfociti B da parte degli antigeni e di altri stimoli

L'antigene e le citochine svolgono un ruolo importante per la sopravvivenza dei linfociti B naïve. I linfociti B naïve follicolari sopravvivono per un periodo di tempo limitato fino all'incontro con l'antigene (vedi Cap. 2). Tale sopravvivenza dipende dai segnali generati dal BCR (*B Cell Receptor*) e dai segnali impartiti dalla citochina BAFF (*B-Cell Activating Factor of the TNF Family*), nota anche come BLyS (*B Lymphocyte Stimulator*), membro della superfamiglia del fattore di necrosi tumorale (*Tumor Necrosis Factor*, TNF), che fornisce i segnali di maturazione e sopravvivenza attraverso il recettore BAFF. BAFF e un ligando a esso correlato (APRIL) possono attivare anche altri due recettori, TACI e BCMA, che partecipano agli stadi più tardivi del processo di attivazione e differenziazione dei linfociti B (argomento che verrà approfondito ulteriormente nel prosieguo di questo capitolo). Tali citochine

sono prodotte principalmente dalle cellule mieloidi presenti nei follicoli linfoidi e nel midollo osseo.

L'attivazione del linfocita B inizia con il riconoscimento dell'antigene da parte delle Ig di membrana che, con le catene Igα e Igβ, formano il BCR dei linfociti B maturi. Il BCR, descritto nel Capitolo 7, svolge due ruoli cruciali nell'attivazione dei linfociti B: in primo luogo, la sua aggregazione provocata dal legame con l'antigene genera i segnali necessari all'attivazione della cellula (vedi Cap. 7). In secondo luogo, l'antigene legato al BCR viene internalizzato e veicolato agli endosomi dove, se è di natura proteica, viene digerito (processato) in peptidi che verranno quindi presentati sulla superficie dei linfociti B per il riconoscimento da parte dei linfociti T. Questa funzione di cellule che presentano l'antigene dei linfociti B verrà approfondita successivamente nel contesto dell'attivazione da parte di antigeni T-dipendenti.

Il riconoscimento dell'antigene dà inizio alla risposta del linfocita B, ma di per sé è generalmente insufficiente a stimolarne in modo significativo la proliferazione e la differenziazione. Per ottenere una risposta completa devono cooperare con il BCR altri stimoli, come le proteine del complemento, i PRR e, nel caso degli antigeni proteici, i linfociti T helper (vedi più avanti).

L'attivazione dei linfociti B è facilitata dal corecettore CR2/CD21, che riconosce frammenti del complemento associati covalentemente all'antigene o che sono parte dell'immunocomplesso che contiene l'antigene (Fig. 12-5, *A*). Generalmente, l'attivazione del complemento da parte dei microbi avviene: in assenza dell'intervento degli anticorpi, tramite la via alternativa o quella lectinica, oppure in presenza di anticorpi, attraverso la via classica (vedi Capp. 4 e 13). In tutte queste condizioni vengono generati frammenti del complemento che legano i microbi. Uno di questi, chiamato C3d, è riconosciuto dal recettore CR2 (chiamato anche CD21), il quale è in grado di aumentare la forza dei segnali di attivazione del BCR e quindi svolge la funzione di corecettore dei linfociti B (vedi Cap. 7). Anche alcuni polisaccaridi di origine non microbica attivano il complemento attraverso la via alternativa o quella lectinica e questa è una delle ragioni per cui tali antigeni sono in grado di attivare risposte anticorpali pur in assenza dell'intervento dei linfociti T.

Attivando i recettori Toll-like (*Toll-Like Receptors*, TLR), i prodotti microbici contribuiscono all'attivazione dei linfociti B (vedi Fig. 12-5, *B*). I linfociti B umani esprimono diversi TLR, come il TLR5, che riconosce la flagellina batterica, il TLR7, che riconosce l'RNA a singola elica, e il TLR9, che riconosce le sequenze ipometilate dei motivi CpG a livello endosomiale (vedi Cap. 4). I linfociti B murini (ma non i linfociti dell'uomo) esprimono anche il TLR4, in grado di riconoscere LPS. Questi PRR (recettori dei profili molecolari) forniscono segnali che aumentano o cooperano con quelli provenienti dal recettore attivato dei linfociti B. Inoltre, l'attivazione delle cellule mieloidi da parte dei PRR può promuovere indirettamente l'attivazione dei linfociti B in due modi diversi. Primo, le cellule dendritiche attivate dai TLR attivano i linfociti T helper, che stimolano i linfociti B durante le risposte agli antigeni proteici, secondo le cellule mieloide stimolate dai TLR producono le citochine APRIL e BAFF che promuovono le risposte B T-indipendente.

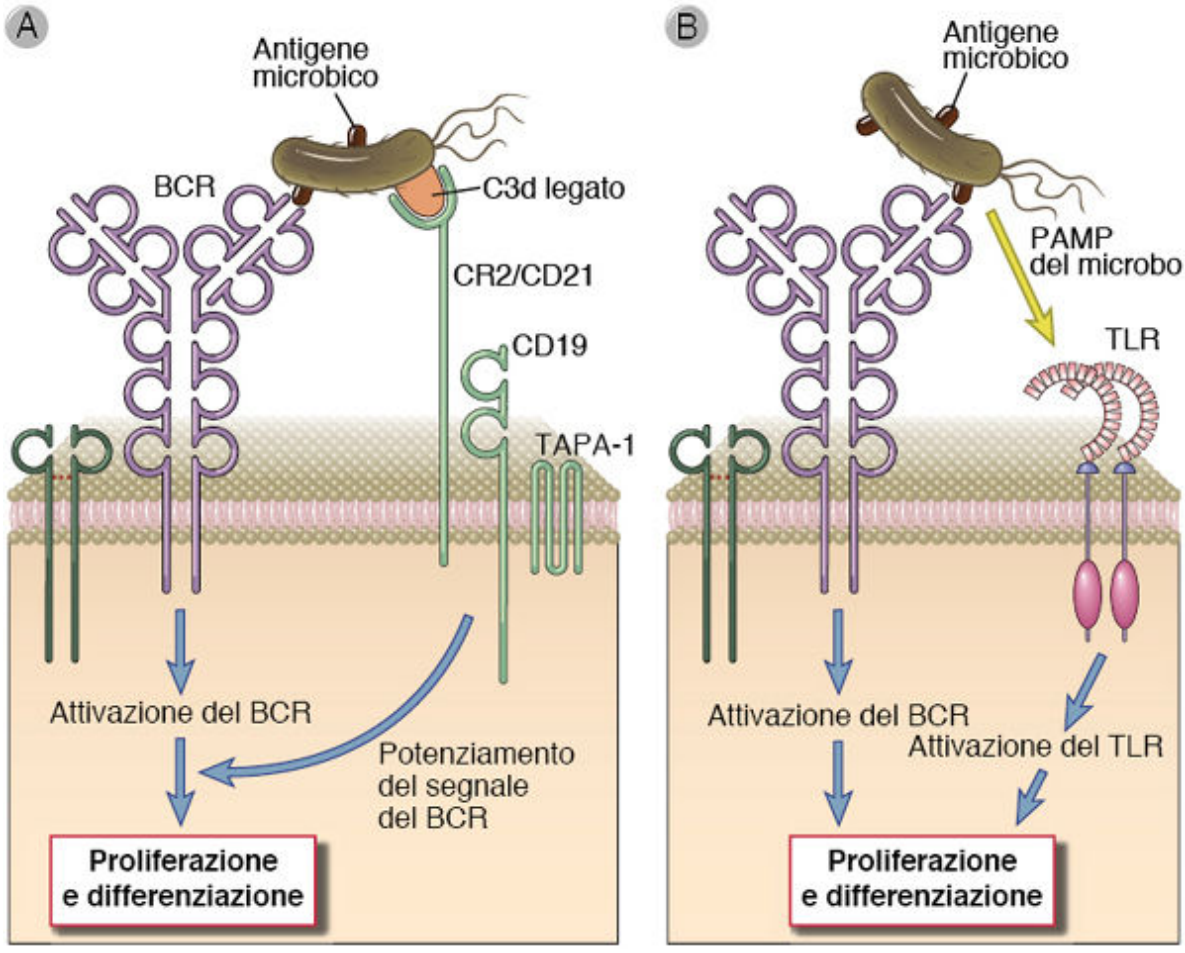


FIGURA 12-5 Ruolo del CR2 e dei recettori Toll-like (TLR) nell'attivazione dei linfociti B. Nelle risposte antimicrobiche, l'attivazione del BCR viene coadiuvata da antigeni rivestiti da frammenti del complemento che possono essere entrambi riconosciuti sia dal BCR sia dal recettore del complemento di tipo 2 (CR2) (**A**), l'attivazione del BCR viene anche potenziata dalla simultanea attivazione dei TLR, espressi dai linfociti B, a opera dei profili molecolari associati ai patogeni (*Patoghen-Associated Molecular Patterns*, PAMP) (**B**).

Attivazione dei linfociti B in seguito al riconoscimento dell'antigene

Il cross-linking del BCR produce una serie di eventi che è diversa a seconda del tipo di antigene: antigeni multivalenti causano la proliferazione e la differenziazione dei linfociti B, mentre antigeni proteici preparano i linfociti B per le successive interazioni con i linfociti T helper (Fig. 12-6). Il riconoscimento dell'antigene promuove l'entrata dei linfociti quiescenti nella fase G_1 del ciclo cellulare. Ciò si accompagna a un aumento delle dimensioni cellulari, della quantità di RNA citoplasmatico e del numero degli organelli biosintetici (tra i quali ci sono i ribosomi). Alcuni linfociti B attivati si differenziano in plasmacellule a breve sopravvivenza che secernono anticorpi. La sopravvivenza dei linfociti B attivati risulta aumentata in seguito all'attivazione di vari geni antiapoptotici, tra cui Bcl-2 (vedi Fig. 15-8). In seguito al riconoscimento dell'antigene, i linfociti B aumentano anche l'espressione delle molecole MHC di classe II e delle molecole costimolatorie B7 rendendo i linfociti B attivati più efficienti nell'attivazione dei linfociti T helper di quanto lo siano quelli B naïve. Infine, si osserva un cambiamento nel profilo di espressione dei recettori per le chemochine e ciò consente ai linfociti B attivati di fuoriuscire dai follicoli.

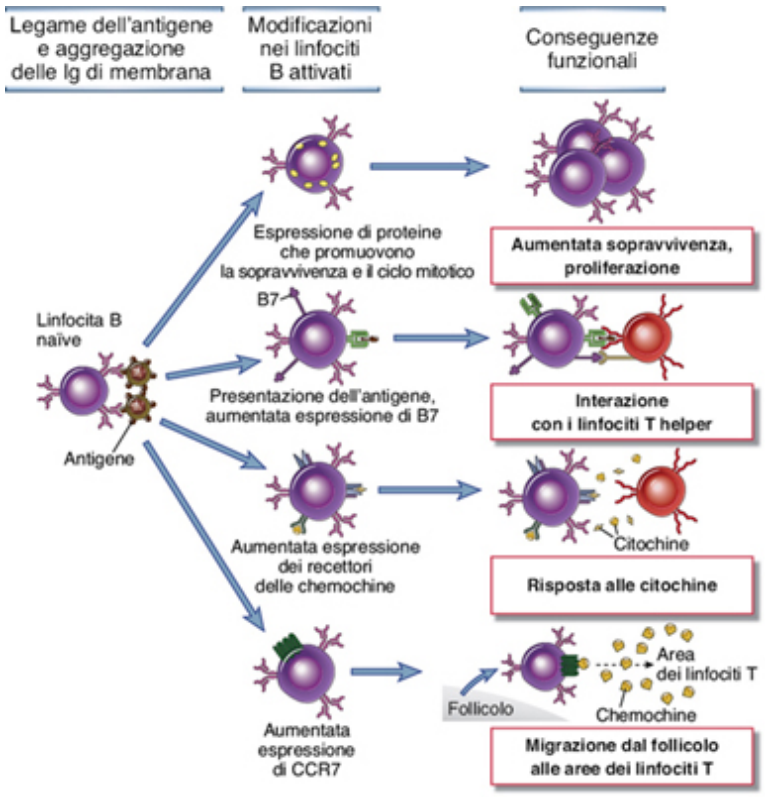


FIGURA 12-6 Risposte funzionali attivate dall'aggregazione del complesso del BCR. L'aggregazione del complesso BCR in risposta al riconoscimento dell'antigene stimola diverse risposte cellulari tra cui: la produzione di proteine che promuovono la sopravvivenza e la proliferazione, l'espressione di molecole costimolatorie e di recettori per citochine, che promuovono l'interazione con e la responsività ai linfociti T helper, e la migrazione dei linfociti B verso i linfociti T in seguito all'aumento dell'espressione di CCR7.

L'importanza del segnale trasdotto dal BCR per le successive risposte cellulari varia a seconda della natura dell'antigene. La maggior parte degli antigeni T-indipendenti, come i polisaccaridi e i glicolipidi, contiene epitopi identici e ripetuti su ciascuna molecola o sulla superficie cellulare. Ne consegue che essi legano e inducono l'aggregazione di un numero elevato di BCR e avviano le risposte dei linfociti B nonostante non vengano riconosciuti dai linfociti T helper. Al contrario, gran parte degli antigeni globulari di natura proteica, nella loro configurazione nativa, possiedono soltanto una copia per molecola di ciascun epitopo. Ne consegue che essi non possono indurre un'efficace aggregazione del BCR e la loro efficienza nell'attivare tale recettore è limitata, tanto da non indurre la proliferazione e la differenziazione dei linfociti B. Ad ogni modo, essi sono in grado di influenzare la sopravvivenza, causare dei cambiamenti nell'espressione dei

recettori per le chemochine e promuovere l’endocitosi degli antigeni. Va comunque osservato che anche alcuni antigeni proteici possiedono epitopi antigenici identici ripetuti, quando questi sono associati al microbo o alla superficie di una cellula, oppure possono diventare multivalenti, quando sono parte di un aggregato.

Gli antigeni proteici vengono internalizzati dal BCR, processati e presentati in forma di peptidi legati alle molecole MCH ai linfociti T helper che sono in grado di stimolare in modo efficiente la proliferazione e la differenziazione dei linfociti B. Infatti, nelle risposte T-dipendenti, la principale funzione delle Ig di membrana non è promuovere la proliferazione e la differenziazione, ma facilitare il legame e l’internalizzazione dell’antigene per la successiva presentazione ai linfociti T helper. Successivamente al riconoscimento dell’antigene da parte dei linfociti B, le risposte umorali che si generano sono molto diverse a seconda che si tratti di una risposta T-dipendente o T-indipendente. Cominceremo a occuparci delle risposte agli antigeni proteici e dell’attivazione dei linfociti T helper.

RISPOSTE ANTICORPALI AGLI ANTIGENI PROTEICI CHE DIPENDONO DAI LINFOCITI T HELPER

La funzione helper dei linfociti T fu scoperta alla fine degli anni Sessanta del Novecento, in studi che mostrarono come le risposte anticorpali richiedano la cooperazione di due diverse popolazioni di cellule, successivamente identificate come linfociti B e T. Questi esperimenti rappresentano una delle prime prove dell’importanza dell’interazione tra due diverse popolazioni del sistema immunitario. Furono necessari molti anni per comprendere che la maggior parte delle cellule helper è costituita da linfociti T $CD4^+CD8^-$ che riconoscono antigeni peptidici presentati su molecole MHC di classe II. Uno dei principali successi dell’immunologia è stata la comprensione dei meccanismi alla base delle interazioni tra linfociti T e B e delle funzioni dei linfociti T helper nella risposta anticorpale.

Eventi che caratterizzano le risposte anticorpali agli antigeni T-dipendenti

Gli antigeni proteici vengono riconosciuti dai linfociti B e T specifici negli organi linfoidi secondari. Più precisamente, queste due popolazioni linfocitarie, una volta attivate cominciano a interagire tra loro per dare inizio alle risposte umorali (Fig. 12-7). L'interazione tra linfociti T e B inizia con il riconoscimento dello stesso antigene da parte di entrambi i tipi di linfociti e segue una precisa sequenza di eventi. I linfociti T $CD4^+$ sono attivati nelle aree T da parte dell'antigene (in forma di peptidi processati) presentato dalle cellule dendritiche e si differenziano in linfociti T helper. I linfociti B naïve sono attivati nei follicoli dallo stesso antigene (nella sua conformazione nativa). I linfociti T helper e i linfociti B attivati migrano gli uni verso gli altri e interagiscono ai margini dei follicoli, dove si sviluppa la risposta anticorporale iniziale. Alcuni linfociti B ritornano all'interno dei follicoli per formare i centri germinativi, dove avranno luogo le risposte anticorporali più specializzate. Ciascuno di questi passaggi sarà descritto in maggiore dettaglio nel proseguo del capitolo.

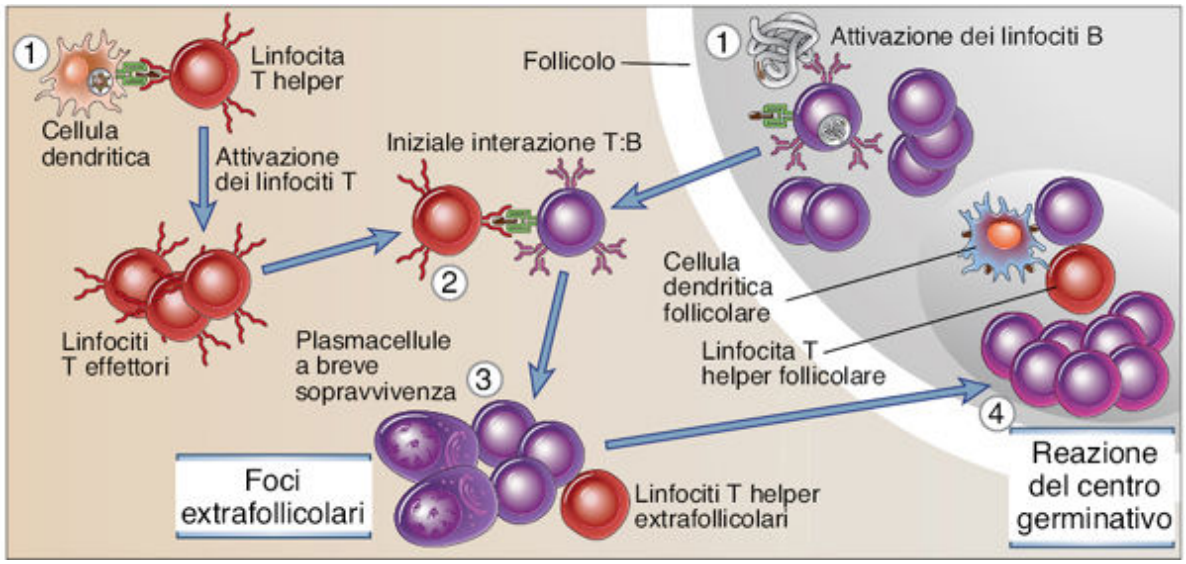


FIGURA 12-7 Sequenza degli eventi che caratterizzano la risposta umorale agli antigeni proteici T-dipendenti. (1) La risposta immunitaria è innescata dal riconoscimento dell'antigene da parte del linfocita B e del linfocita T $CD4^+$. (2) I linfociti attivati migrano gli uni verso gli altri e interagiscono tra loro. Ciò induce la proliferazione e la differenziazione dei linfociti B. (3) La restimolazione dei linfociti B a opera dei linfociti T helper in regioni extrafollicolari determina un precoce scambio di classe e la generazione di plasmacellule a breve sopravvivenza, mentre l'attivazione dei linfociti T da parte dei linfociti B determina la differenziazione in linfociti T helper follicolari. (4) Gli eventi più tardivi che si verificano nei centri germinativi e consistono nel processo di mutazione somatica e di selezione delle cellule a maggiore affinità (maturazione dell'affinità), in un ulteriore scambio di classe, nella generazione di linfociti B della memoria e nella generazione di plasmacellule a lunga sopravvivenza.

Attivazione iniziale e migrazione dei linfociti B e dei linfociti T helper

L'attivazione da parte dello stesso antigene dei linfociti B e T è essenziale per la loro interazione e localizzazione e per aumentare la probabilità di una loro interazione (Fig. 12-8). La frequenza di linfociti B o T naïve specifici per un determinato epitopo è estremamente bassa, aggirandosi nell'ordine di 1 su 10^5-10^6. Inoltre, i linfociti sia B sia T devono essere stati attivati e devono riuscire a interagire fisicamente per poter generare una risposta anticorpale. Ciò avviene in parte grazie alla redistribuzione dei linfociti all'interno dell'organo linfoide, in seguito al riconoscimento dell'antigene. I linfociti T helper modificano radicalmente il loro profilo di espressione dei recettori per le chemochine, diminuendo l'espressione del recettore CCR7 e aumentando quella di CXCR5. Tale combinazione spinge i linfociti T helper attivati a lasciare le aree T e a migrare verso il follicolo dove è prodotto CXCL13 (il ligando di CXCR5) da parte delle cellule dendritiche follicolari e da altre cellule stromali follicolari. Come discusso in precedenza, i linfociti B che hanno riconosciuto l'antigene riducono l'espressione del recettore CXCCR5 e aumentano quella di CCR7. Questo determina che i linfociti B attivati migrino verso le aree T seguendo un gradiente di concentrazioni di CCL19 e CCL21, i ligandi del CCR7. I linfociti B attivati da antigeni proteici esprimono anche il CD69 che impedisce l'espressione in membrana del recettore per la sfingosina 1-fosfato, causando la loro ritenzione a livello linfonodale (vedi Cap. 3). Ne risulta che i linfociti B e T attivati dall'antigene tendono a muoversi gli uni verso gli altri.

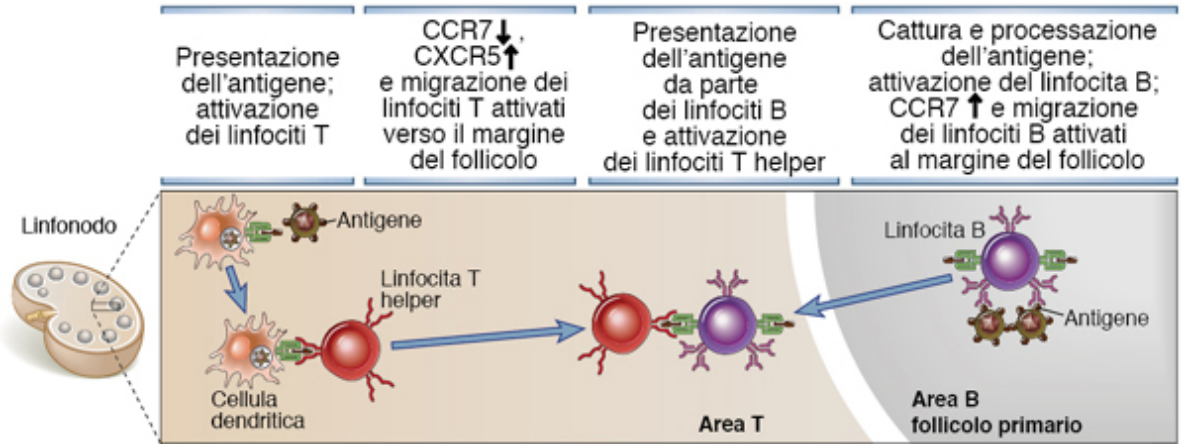


FIGURA 12-8 Migrazione dei linfociti B e interazione con i linfociti T helper. Il linfocita T helper e il linfocita B attivati dall'antigene migrano l'uno verso l'altro in risposta ai segnali delle chemochine, venendo in contatto nella zona al margine con i follicoli primari.

Gli antigeni proteici vengono endocitati dai linfociti B e presentati in una forma che può essere riconosciuta dai linfociti T helper, questo rappresenta il passo successivo nel processo di attivazione del linfocita B da parte di un antigene proteico.

Presentazione dell'antigene da parte dei linfociti B ed effetto aptene-carrier

I linfociti B attivati endocitano l'antigene proteico, lo processano e lo presentano ai linfociti T CD4$^+$ montato su molecole MCH di classe II (Fig. 12-9). La via di presentazione su molecole MCH di classe II è stata descritta nel Capitolo 6. I peptidi presentati dai linfociti B ai linfociti T helper sono gli stessi che erano stati inizialmente presentati dalle cellule dendritiche al linfocita T CD4$^+$ naïve nelle aree T linfonodali. Dato che il BCR riconosce con elevata affinità un epitopo della proteina nativa, i linfociti B specifici interagiscono con l'antigene con maggiore efficienza (cioè a concentrazioni inferiori) degli altri linfociti B che non sono specifici per quell'antigene. Questa è la ragione per cui il linfociti B specifici rispondono preferenzialmente a un antigene rispetto a quelli circostanti. Quindi un antigene proteico che attiva una risposta B in modo T-dipendente utilizza almeno due diversi epitopi della proteina nativa. Uno di questi viene inizialmente riconosciuto in modo altamente specifico dal linfocita B, mentre un secondo, un peptide lineare prodotto mediante la processazione

della proteina, si lega all'MHC di classe II e verrà riconosciuto dai linfociti T helper. Gli anticorpi che verranno prodotti sono generalmente specifici per determinanti conformazionali dell'antigene, poiché l'Ig di membrana del linfocita B è in grado di legarsi a epitopi conformazionali presenti nella proteina nativa. Tale caratteristica è alla base dell'estrema specificità della risposta anticorpale ed è indipendente dal fatto che i linfociti T helper riconoscano invece esclusivamente epitopi lineari. Infatti, un singolo linfocita B specifico per un epitopo nativo, pur legando ed endocitando una specifica proteina, può presentare diversi peptidi in associazione a molecole MHC di classe II, a diversi linfociti T helper. Nonostante ciò, l'anticorpo prodotto alla fine di questo processo sarà specifico per la proteina nativa.

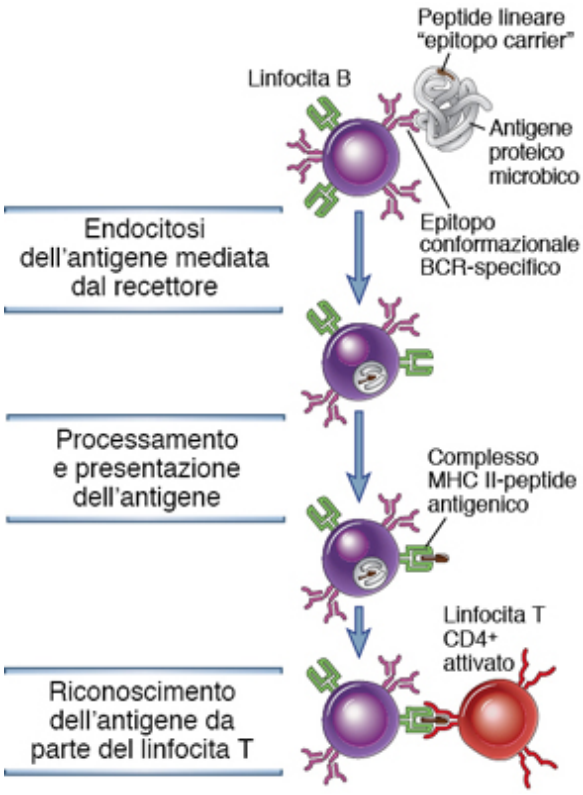


FIGURA 12-9 Presentazione dell'antigene ai linfociti T helper da parte dei linfociti B. Gli antigeni proteici legati alle Ig di membrana sono endocitati e processati e i loro frammenti peptidici presentati in associazione alle molecole MHC di classe II. I linfociti T helper si attivano in seguito al riconoscimento dei complessi MHC- peptide espressi dai linfociti B. Nelle risposte ai coniugati aptene-carrier, il coniugato è endocitato in seguito al riconoscimento dell'aptene da parte di un linfocita B specifico, la proteina carrier è processata dal linfocita B e i peptidi provenienti dal carrier sono presentati ai linfociti T helper.

I principi fin qui descritti per la collaborazione tra i linfociti B e T ci possono aiutare a comprendere un fenomeno definito **effetto aptene-carrier**. Lo studio delle risposte anticorpali ai coniugati aptene-carrier ha fornito le prime indicazioni che hanno poi dimostrato come l'importanza della presentazione degli antigeni da parte dei linfociti B contribuisca in modo fondamentale allo sviluppo della risposta immunitaria umorale. Gli apteni (come il dinitrofenolo) sono piccole molecole chimiche che possono essere riconosciute dagli anticorpi ma, di per sé, non sono immunogeniche. Comunque, se gli apteni vengono associati a proteine (che in questo caso svolgono la funzione di carrier), i coniugati risultanti acquisiscono la capacità di evocare la risposta anticorpale verso gli apteni. Le risposte anticorpali ai coniugati aptene-proteina presentano tre caratteristiche importanti. In primo luogo, tali risposte richiedono la presenza sia dei linfociti B, specifici per l'aptene, sia dei linfociti T helper, specifici per il carrier proteico. In secondo luogo, per stimolare efficacemente la risposta, l'aptene e il carrier devono necessariamente essere legati fisicamente, non essendo sufficiente somministrarli in modo separato. In terzo luogo, l'interazione è ristretta per molecole MHC di classe II, cioè i linfociti T helper cooperano solo con i linfociti B che esprimono sulla loro superficie molecole MHC di classe II che sono identiche a quelle che erano state riconosciute inizialmente dai linfociti T naïve sulle cellule dendritiche. Tutte queste caratteristiche possono essere ritrovate nel processo di presentazione dell'antigene da parte del linfocita B. Il linfocita B specifico per l'aptene lega il coniugato aptene-carrier attraverso l'aptene, lo endocita, lo processa e presenta i peptidi derivati dal carrier ai linfociti T helper specifici per quest'ultimo (vedi Fig. 12-9). Quindi, i due linfociti cooperanti riconoscono epitopi differenti dello stesso complesso. L'aptene è responsabile dell'efficace internalizzazione della proteina carrier all'interno del linfocita B, spiegando così la ragione per cui le due strutture devono essere legate fisicamente. La necessità della presentazione in associazione a molecole MHC di classe II dei peptidi derivati dal carrier spiega invece la restrizione per MHC delle interazioni tra linfociti B e T.

Le caratteristiche della risposta umorale responsabili dall'effetto aptene-carrier si applicano a tutti gli antigeni proteici nei quali un determinante (normalmente una struttura conformazionale nativa) viene riconosciuto dai linfociti B (comportandosi quindi da aptene), mentre un altro determinante,

sotto forma di peptide lineare associato a molecole MHC di classe II, viene riconosciuto dai linfociti T helper (comportandosi quindi da carrier). L'effetto aptene-carrier è alla base dello sviluppo di vaccini coniugati (discussi più avanti nel capitolo), che contengono dei carboidrati, gli epitopi riconosciuti dai linfociti B, legati a delle proteine, gli epitopi riconosciuti dai linfociti T.

Ruolo dell'interazione CD40L:CD40 nell'attivazione dei linfociti B da parte di antigeni T-dipendenti

I linfociti T helper attivati esprimono sulla loro superficie il ligando del recettore CD40 (CD40L) che interagendo con il suo recettore, espresso dai linfociti B attivati, promuove la proliferazione e la differenziazione dei linfociti B; questo avviene inizialmente nei foci extrafollicolari e successivamente nei centri germinativi (Fig. 12-10). Si ricordi che CD40 appartiene alla famiglia dei recettori per il TNF (vedi Cap. 10). Il ligando CD40L (CD154) è una proteina trimerica espressa dai linfociti T, strutturalmente omologa al TNF e al ligando di Fas. CD40 è espresso costitutivamente sulla membrana dei linfociti B, mentre CD40L viene espresso sulla superficie dei linfociti T helper in seguito all'attivazione da parte dell'antigene e delle molecole costimolatorie. Quando i linfociti T helper attivati si legano ai linfociti B che presentano l'antigene, CD40L dei linfociti T interagisce con CD40 dei linfociti B. Ciò determina un'alterazione nella struttura trimerica di CD40 che, a sua volta, induce il reclutamento in corrispondenza dei suoi domini citoplasmatici di proteine citosoliche definite TRAF (*Receptor-Associated Factors*, TNF). Una volta legate alla porzione citoplasmatica di CD40, TRAF innescano una via di trasduzione che porta all'attivazione e alla traslocazione nucleare di fattori di trascrizione come il fattore nucleare κB (*Nuclear Factor-κB*, NF-κ) e AP-1 (*Activation Protein 1*) che stimolano la proliferazione dei linfociti B e aumentano la sintesi e la secrezione delle Ig. Vie di trasduzione del segnale molto simili vengono utilizzate anche dai recettori per il TNF (vedi Cap. 7). Come vedremo in seguito, l'attivazione dei fattori di trascrizione promossa da CD40 è fondamentale per le successive reazioni del centro germinativo. Anche l'attivazione delle cellule dendritiche e dei macrofagi da parte dei

linfociti T richiede l'interazione di CD40L (dei linfociti T) con CD40 (espresso dalle cellule dendritiche e dai macrofagi) (vedi Capp. 6 e 10).

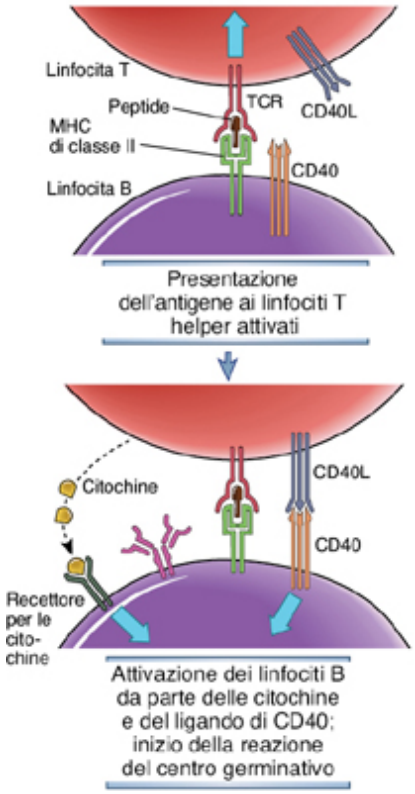


FIGURA 12-10 Meccanismi di attivazione dei linfociti B da parte dei linfociti T helper. I linfociti T helper attivati dal riconoscimento dell'antigene presentato dai linfociti B cominciano a esprimere CD40L, che lega CD40 espresso dai linfociti B che ne stimola la proliferazione e differenziazione. Anche le citochine prodotte dai linfociti T helper contribuiscono alle risposte dei linfociti B.

Mutazioni a carico del gene di *CD40L* sono responsabili di una malattia chiamata **sindrome da iper-IgM legata al cromosoma X**, che è caratterizzata da difetti nella produzione anticorpale, nello scambio isotipico, nella maturazione dell'affinità e nella generazione di linfociti B della memoria in risposta ad antigeni proteici, oltre a difetti nell'immunità cellulare (vedi Cap. 21). Difetti simili si osservano anche in topi geneticamente difettivi per *CD40* o *CD40L*. Il virus di Epstein-Barr (*Epstein-Barr Virus*, EBV), virus a DNA, infetta i linfociti B umani inducendone la proliferazione, che può sfociare nell'immortalizzazione delle cellule, con conseguente sviluppo di linfomi. Il dominio citoplasmatico di una proteina trasformante dell'EBV, definita LMP1 (*Latent Membrane Protein 1*), si lega a TRAF a cui, come già accennato, si lega anche il

dominio citoplasmatico di CD40, per indurre la proliferazione dei linfociti B. Quindi, LMP1 dell'EBV è funzionalmente omologa alle molecole di trasduzione del segnale fisiologico nei linfociti B. Questo significa che l'EBV si è impossessato, a proprio vantaggio, di un meccanismo fisiologico di attivazione dei linfociti B per promuovere la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule da esso infettate.

I linfociti T helper attivati secernono anche citochine che agiscono in modo coordinato con CD40L per stimolare le risposte B. Il ruolo principale svolto dalle citochine di origine T nella risposta umorale si esplica durante lo scambio isotipico, che verrà descritto più avanti. Diverse citochine svolgono la loro azione anche durante le fasi iniziali della proliferazione e della differenziazione B, ma non è ancora chiaro se il loro ruolo sia essenziale.

Successivamente alle fasi iniziali dell'interazione dei linfociti B con i linfociti T helper all'interfaccia tra i follicoli e le regioni T, l'attivazione dei linfociti B può avvenire in due diverse regioni: all'esterno dei follicoli in foci extrafollicolari, o al loro interno, nei centri germinativi. La risposta dei linfociti B è diversa a seconda del sito in cui avviene l'attivazione (Tab. 12-1).

TABELLA 12-1 Risposte dei linfociti B extrafollicolari e dei centri germinativi

Caratteristica	Extrafollicolari	Follicolari/Del centro germinativo
Localizzazione	Cordoni midollari dei linfonodi e giunzione tra le aree T e la polpa rossa della milza	Follicoli secondari
Attivazione di CD40	Richiesta	Richiesta
Linfociti T helper specializzati	Linfociti T helper extrafollicolari	Linfociti T_{FH} nei centri germinativi
Espressione dell'enzima AID	Sì	Sì
Scambio di classe	Sì, limitato	Sì, elevato
Ipermutazione somatica	Limitata	Elevata
Affinità anticorpale	Bassa	Elevata
Linfociti B differenziati terminalmente	Plasmacellule a breve sopravvivenza (vita media di circa 3 giorni)	Plasmacellule a lunga sopravvivenza, che migrano al midollo osseo o al MALT, e cellule di memoria

Fattori di trascrizione dei linfociti B Blimp-1 Bcl-6
AID *(Activation-Induced cytidine Deaminase)* citidina deaminasi indotta dall'attivazione; Bcl-6, B *Cell lymphoma 6*; Blimp-1, *B lymphocyte – induced maturation protein 1*; MALT (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*), tessuto linfoide associato alle mucose; T_{FH} (*Follicular Helper T cell*), linfociti T helper follicolari. *(Adattata da Vinuesa CG, Sanz I, Cook MC: Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease, Nature Reviews Immunology 9:845-857, 2009.)*

Attivazione extrafollicolare dei linfociti B

L'attivazione dei linfociti B nei foci extrafollicolari fornisce una prima risposta anticorporale agli antigeni proteici e prepara la successiva risposta del centro germinativo, che si sviluppa più lentamente ma che è più efficace. La risposta ad antigeni T-dipendenti dei linfociti B nei foci extrafollicolari produce anticorpi a bassa affinità che possono circolare e limitare la diffusione di un'infezione. La risposta extrafollicolare contribuisce anche alla formazioni dei linfociti T helper follicolari (linfociti T_{FH}) che migrano nel follicolo e sono necessari per la formazione del centro germinativo. Inoltre, anche alcuni linfociti B attivati dei foci extrafollicolari ritornano nel follicolo, partecipando alla formazione del centro germinativo e subendo alcune modificazioni che determinano una risposta anticorporale più potente e di durata maggiore. Ognuno di questi foci può contenere da 100 a 200 plasmacellule. Nella milza, i foci extrafollicolari si formano nelle regioni esterne dei manicotti linfoidi periarteriolari (*PeriArteriolar Lymphoid Sheath*, PALS) o tra le regioni T e la polpa rossa. Strutture simili si osservano nei cordoni midollari dei linfonodi. I linfociti B attivati dai linfociti T helper tramite CD40L nei foci extrafollicolari vanno incontro a scambio isotipico. Le cellule generate nei foci extrafollicolari che producono anticorpi, tra cui i plasmablasti circolanti e le plasmacellule tissutali, sono prevalentemente cellule a breve sopravvivenza, che non acquisiscono la capacità di migrare in siti distali quali il midollo osseo. La limitata quantità di anticorpi prodotta nei foci può contribuire alla formazione di immunocomplessi (che contengono l'antigene, gli anticorpi stessi e i frammenti del complemento) che vengono catturati dalle cellule dendritiche follicolari (*Follicular Dendritic Cells*, FDC) nei follicoli degli organi linfoidi secondari. Le cellule dendritiche follicolari, forse attivate da questi immunocomplessi, producono chemochine che attirano un limitatissimo

numero di linfociti B attivati (forse solo uno o due) dai foci extrafollicolari verso il follicolo, per dare inizio alla reazione del centro germinativo.

Reazione del centro germinativo

Gli eventi caratteristici della risposta anticorporale che dipende dai linfociti T helper include la maturazione dell'affinità, lo scambio isotipico, nonché la generazione di linfociti B della memoria e di plasmacellule a lunga sopravvivenza. Questa risposta ha luogo principalmente in strutture organizzate, chiamate centri germinativi, che si generano all'interno dei follicoli linfoidi. L'insieme degli eventi che susseguono allo sviluppo dei centri germinativi, quali il complesso processo di diversificazione genetica dei linfociti B attivati e la selezione delle cellule che possiedono le caratteristiche migliori per rispondere all'antigene, prende il nome di reazione del centro germinativo. I centri germinativi si sviluppano nei 4-7 giorni successivi all'inizio della risposta dei linfociti B. A questo punto, un numero limitato di linfociti B che si erano attivati nei foci extrafollicolari ritorna nei follicoli per dar luogo a un rapido processo proliferativo in una regione distinta del follicolo (Fig. 12-11). Tale regione fu originariamente definita *centro germinativo* in quanto si credeva che fosse il sito in cui venivano generati i nuovi linfociti. All'interno del centro germinativo è presente una zona scura popolata da linfociti B proliferanti. Il tempo di duplicazione di questi linfociti (definiti anche *centroblasti*) è stimato in 6-12 ore, il che significa che un singolo linfocita può dare origine a un clone di 5000 cellule in meno di 5 giorni. Tali cloni saranno costituiti da linfociti B di dimensioni inferiori alla norma, talvolta definiti *centrociti*, destinati a ulteriori processi di differenziazione e selezione nella zona chiara (vedi più avanti). I linfociti B dei centri germinativi esprimono un repressore della trascrizione noto con il nome di Bcl-6 (*B cell lymphoma gene 6*), di cui parleremo più avanti quando prenderemo in considerazione la regolazione trascrizionale dello sviluppo dei linfociti B.

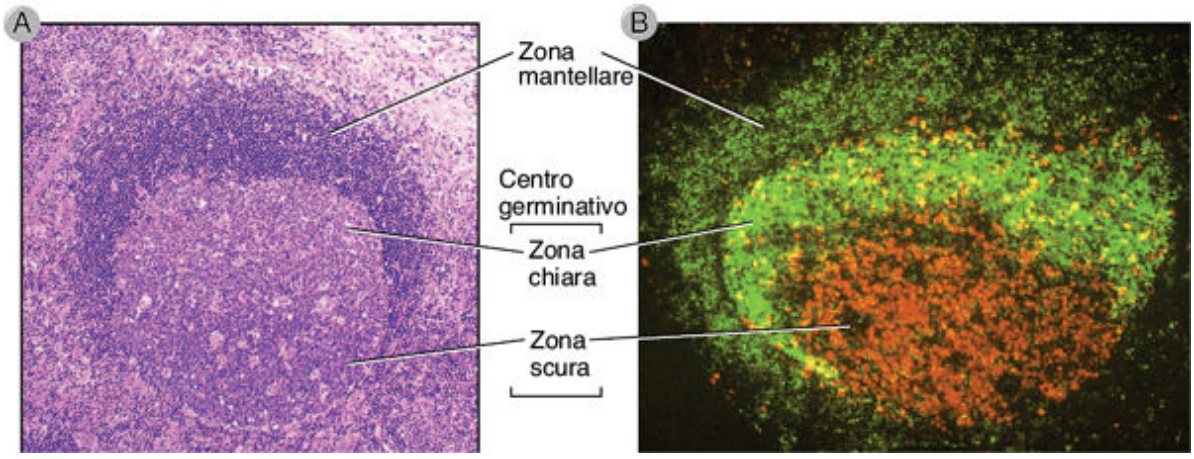


FIGURA 12-11 Il centro germinativo negli organi linfoidi secondari. A. Il centro germinativo è all'interno del follicolo e comprende una zona scura e una zona adiacente più chiara. **B.** La zona più chiara contiene le cellule dendritiche follicolari, colorate con l'anticorpo anti-CD23 (*verde*); la zona più scura contiene i linfociti B proliferanti, colorati con l'anticorpo anti-Ki67 (*rosso*), che identifica le cellule mitoticamente attive. *(**A,** Per gentile concessione del Dr. James Gulizia, Department of Pathology, Brigham e Women's Hospital, Boston, Massachusetts. **B,** Adattata da Liu YJ, Johnson GD, Gordon J, MacLennan IC: Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses, Immunology Today 13:17-21. Copyright © 1992, riprodotta per gentile concessione di Elsevier.)*

L'architettura dei follicoli linfoidi, così come gli eventi che si verificano nei centri germinativi, dipende dalla presenza delle **cellule dendritiche follicolari** (**FDC**). Queste cellule si ritrovano solo nei follicoli linfoidi ed esprimono recettori per i frammenti del complemento (CR1, CR2 e CR3) e recettori per Fc (FcR), tutti coinvolti nella stimolazione e nella selezione dei linfociti B del centro germinativo (vedi più avanti). Le FDC non sono di origine midollare e non esprimono molecole MHC di classe II. Nonostante il loro nome, sono diverse dalle classiche cellule dendritiche che invece esprimono molecole MHC di classe II, catturano l'antigene nei tessuti periferici e lo trasportano negli organi linfoidi secondari per presentarlo ai linfociti T. A livello morfologico, le FDC presentano lunghi prolungamenti citoplasmatici che vanno a costituire una sorta di intelaiatura intorno alla quale si forma il centro germinativo. La reazione del centro germinativo consiste di fasi successive (Fig. 12-12). I linfociti B in rapida proliferazione si accumulano in una zona dal colore scuro, che non contiene FDC né linfociti T. La piccola quota di progenie di linfociti B non proliferanti migra invece verso l'adiacente zona chiara, dove viene a contatto con i prolungamenti citoplasmatici delle FDC ed entra in contatto con i linfociti T_{FH}; questa è anche la zona dove avverranno i successivi eventi di selezione.

Nel follicolo, il contorno costituito da linfociti B naïve che circonda il centro germinativo viene chiamato zona mantellare.

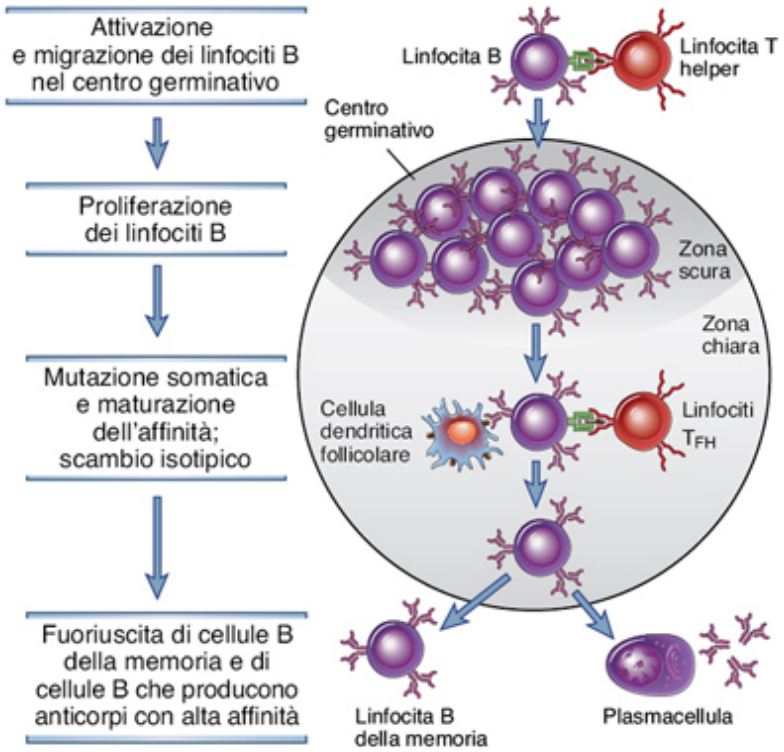


FIGURA 12-12 Reazione del centro germinativo in un linfonodo. I linfociti B attivati migrano all'interno del follicolo dove, proliferando attivamente, formeranno la zona scura. Questi linfociti B vanno incontro a un intenso scambio di classe e alle mutazioni somatiche a carico dei geni V. In seguito, i linfociti B migrano nella zona chiara, dove incontrano le cellule dendritiche follicolari (FDC) che presentano l'antigene e i linfociti T_{FH}. I linfociti B dotati di recettori Ig con maggiore affinità sopravvivranno selettivamente e si differenzieranno in linfociti B secernenti anticorpi o in linfociti B della memoria. Le cellule che producono anticorpi si localizzano nel midollo osseo sotto forma di plasmacellule a lunga sopravvivenza, le cellule della memoria invece vanno incontro a ricircolo.

La formazione dei centri germinativi dipende da CD40L, espresso dai linfociti T_{FH}, che interagisce con CD40 espresso dai linfociti B. Questa interazione è fondamentale affinché possa avvenire la proliferazione dei linfociti B, processo che è alla base dell'espansione nei centri germinativi, nonché per lo scambio isotipico e la maturazione dell'affinità. La formazione dei centri germinativi è difettiva in modelli genetici sperimentali di deficit di CD40, o del suo ligando, e in presenza di mutazioni a carico di questi due geni, come osservato nell'uomo.

Induzione dei linfociti follicolari T helper

Nei 4-7 giorni successivi al riconoscimento dell'antigene, i linfociti B attivati promuovono la differenziazione di alcuni dei linfociti T precedentemente attivati in linfociti T_{FH}. Queste cellule svolgono un ruolo fondamentale nella formazione e nel funzionamento dei centri germinativi e vengono attirate all'interno dei follicoli in risposta a CXCL13, una chemochina che lega CXCR5, un recettore da loro espresso a elevati livelli.

Oltre a CXCR5, i linfociti T_{FH} esprimono il recettore ICOS (*Inducible Costimulator*), PD-1 (*Programmed Death-1*), la citochina IL-21 e il fattore di trascrizione Bcl-6. I linfociti T_{FH} hanno caratteristiche fenotipiche distinte dai linfociti T_H1, T_H2, T_H17 e dai linfociti T regolatori, descritti nel Capitolo 10. La differenziazione dei linfociti T_{FH} necessita di due fasi: l'attivazione iniziale dei linfociti $CD4^+$ T naïve da parte delle cellule che presentano l'antigene e la successiva attivazione da parte dei linfociti B (Fig. 12-13). La scelta tra una differenziazione a T_H1, T_H2 o T_H17, da una parte, o di T_{FH} dall'altra dipende in parte dalla forza dell'interazione tra i complessi MHC di classe II-peptide, presenti sulle cellule dendritiche e il recettore dei linfociti T presente sui linfociti $CD4^+$ T naïve. Una forte attivazione del TCR da parte delle cellule dendritiche causa l'espressione del repressore della trascrizione Bcl-6 e di bassi livelli della catena α del recettore IL-2 (IL-2R) sui linfociti $CD4^+$ T. L'espressione di Bcl-6 insieme a un debole segnale da parte di IL-2R inibisce la differenziazione verso T_H1, T_H2 o T_H17. Alcuni di questi linfociti T attivati inizia a esprimere CXCR5. La differenziazione dei linfociti T_{FH} si completa con l'attivazione da parte dei linfociti B attivati. È noto che una serie di molecole espresse dai linfociti B e dai linfociti T helper svolge un ruolo fondamentale nella generazione dei linfociti T_{FH}. La molecola costimolatoria ICOS, della famiglia di CD28, espressa dai T_{FH}, svolge un ruolo cruciale nelle reazioni del centro germinativo. L'interazione di ICOS con il suo ligando, espresso dai linfociti B, promuove la differenziazione dei linfociti T_{FH}. Le interazioni tra i linfociti B attivati e i linfociti T helper sono regolate da integrine e da molecole costimolatorie della famiglia SLAM. Una delle molecole di trasduzione che si associa con

le proteine della famiglia SLAM nei T_{FH} è SAP, questa proteina serve a stabilizzare l'espressione di molecole che regolano la trascrizione che sono necessaire per lo sviluppo dei T_{FH}, in modo particolare Bcl-6. SAP è mutato in pazienti affetti da una malattia nota come sindrome linfoproliferativa associata al cromosoma X, caratterizzata da difetti della produzione anticorpale e delle risposte T citotossiche (vedi Cap. 21).

FIGURA 12-13 Eventi molecolari nella generazione dei linfociti T helper follicolari. La generazione dei linfociti T_{FH} implica una serie di successive attivazioni dei linfociti T, prima da parte delle cellule dendritiche e poi dei linfociti B attivati. I linfociti T_{FH} differenziati migrano all'interno dei centri germinativi, dove attivano i linfociti B.

La citochina che identifica i linfociti T_{FH} è IL-21. Essa è necessaria per lo sviluppo del centro germinativo e contribuisce alla generazione delle plasmacellule. La produzione di IL-21da parte dei linfociti T_{FH}, inoltre, agevola la selezione dei linfociti B nei centri germinativi e la loro differenziazione in plasmablasti. Oltre a IL-21, i linfociti T_{FH} producono altre citochine, tra cui IFN-γ e IL-4, oltre a bassi livelli di IL-17. Tutte queste citochine partecipano al processo dello scambio isotipico.

I linfociti T_{FH} svolgono diverse importanti funzioni nell'attivazione e nella differenziazione dei linfociti B nel corso della reazione del centro germinativo. Tali funzioni dipendono da diversi segnali, tra cui ICOSL, CD40L e IL-21, che saranno trattati in maggiore dettaglio nel proseguo del capitolo.

Scambio di classe (isotipico) della catena pesante

Nelle risposte T-indipendenti, una parte della progenie dei linfociti B attivati che esprime IgM e IgD va incontro allo scambio di classe (isotipico) delle catene pesanti, per produrre anticorpi di classe diversa (γ, α, ed ε (Fig. 12-14). Lo scambio di classe avviene in parte anche nei linfociti B dei foci extrafollicolari grazie ai linfociti T helper. La capacità dei linfociti B di produrre diverse classi anticorpali conferisce una notevole plasticità alla risposta anticorpale poiché le diverse classi sono dotate di differenti funzioni effettrici in risposta ai diversi tipi di agenti infettivi. I linfociti B modificano

l’isotipo degli anticorpi che producono, modificando le regioni costanti delle catene pesanti e mantenendo inalterata la specificità per l’antigene (determinata dalle regioni variabili). I meccanismi molecolari responsabili di tali modificazioni saranno descritti in seguito.

FIGURA 12-14 Scambio isotipico delle catene pesanti delle Ig. I linfociti B attivati dai segnali che derivano dai linfociti T helper (CD40L e citochine) subiscono il processo di scambio isotipico per la produzione di diverse classi di Ig, responsabili di diverse funzioni effettrici. Nella figura sono rappresentati alcuni esempi di scambio isotipico. ll ruolo dell’IFN-γ nello scambio isotipico è stato appurato solo nei roditori.

Lo scambio isotipico viene regolato dalle citochine prodotte dai linfociti T helper attivati dai diversi tipi di microrganismi. IFN-γ promuove lo scambio isotipico verso IgG (questa funzione di IFN-γ non è ancora stata confermata nell’uomo) e IL-4 induce lo scambio a IgE. La risposta a molti virus e batteri intracellulari consiste nella produzione di IgG che bloccano l’ingresso dei microrganismi nelle cellule dell’ospite e potenziano la fagocitosi a opera dei macrofagi. In effetti, i virus e molti batteri attivano soprattutto i linfociti T_H1 che producono l’IFN-γ e attivano i linfociti T_{FH} a produrre quantità maggiori di IFN-γ. La principale risposta anticorpale verso i parassiti (soprattutto gli elminti) si basa sulla produzione di IgE, che partecipano all’eliminazione del parassita da parte degli eosinofili e dei mastociti (vedi Capp. 13 e 16); le IgE sono anche responsabili delle reazioni di ipersensibilità immediata (o allergia) (vedi Cap. 20).

È probabile che gli elminti influenzino la differenziazione dei linfociti T_{FH} e che inducano queste cellule a produrre citochine T_H2 durante la reazione del centro germinativo.

Inoltre i linfociti B possono andare incontro a un diverso scambio isotipico anche in relazione al sito anatomico in cui risiedono, in parte grazie alle citochine prodotte in queste sedi. Per esempio, i linfociti B degli organi linfoidi associati alle mucose producono IgA, che in effetti rappresentano la classe di anticorpi trasportata più efficientemente nelle secrezioni mucose attraverso gli epiteli (vedi Cap. 14), dove intercettano i microrganismi che tentano di invadere il tessuto. Lo scambio verso le IgA è stimolato dal TGF-β *(Transforming Growth Factor-β,* fattore di crescita trasformante β), prodotto da molti tipi cellulari, tra cui i linfociti T helper. Anche BAFF e

APRIL, due citochine della famiglia del TNF, stimolano lo scambio isotipico a IgA. Dato che queste citochine sono prodotte da cellule mieloidi, questo significa che la stimolazione delle risposte IgA può avvenire anche senza il coinvolgimento dei linfociti T. Gli individui che ereditano una mutazione nel gene TACI, il gene che codifica per uno dei recettori per queste citochine, mostrano un difetto specifico nella produzione di IgA (vedi Cap. 21).

L'attivazione da parte di CD40 coopera con l'azione alle citochine nell'indurre lo scambio isotipico. L'ingaggio di CD40 causa l'attivazione dell'enzima AID che, come vedremo successivamente, è cruciale sia per lo scambio isotipico sia per il processo di maturazione dell'affinità. Il ruolo svolto da CD40 e da AID nello scambio isotipico è ben dimostrato nell'uomo e nel topo privi di CD40, CD40L o AID. In tutte queste condizioni la produzione anticorpale verso antigeni proteici è caratterizzata dalla presenza di IgM e scambio di classe quasi inesistente.

Il meccanismo molecolare attraverso cui avviene lo scambio di classe è un processo di ricombinazione in cui la regione del DNA che codifica per la catena pesante dell'Ig viene tagliata e ricombinata in modo tale per cui l'esone VDJ, che codifica il dominio V, viene posto accanto a una regione C più a valle e il DNA interposto viene eliminato (Fig. 12-15). Questi eventi di ricombinazione coinvolgono sequenze nucleotidiche definite regioni di scambio, poste negli introni tra le regioni J e C al 5′ di ogni locus C_H, fatto salvo il gene δ. Queste regioni hanno una lunghezza variabile da 1 a 10 kb, contengono numerose sequenze di DNA ricche di sequenze GC ripetute e si trovano a monte di ogni gene codificante per una catena pesante. A monte di ogni regione di scambio è presente un piccolo esone definito esone I (iniziatore della trascrizione), preceduto da una regione promotrice. CD40 e le citochine avviano lo scambio di classe attivando la trascrizione a partire da un determinato promotore di una regione I, determinando la trascrizione dell'esone I, della regione di scambio e dell'esone C_H adiacente. Questi trascritti (definiti trascritti germinativi) non sono tradotti in proteine ma sono necessari affinché si realizzi lo scambio isotipico. I trascritti germinativi si osservano sia a livello del locus μ sia a valle del locus della catena pesante coinvolta nello scambio di classe. In ognuno di questi siti, il trascritto germinativo facilita la rottura del DNA a doppia elica, come vedremo successivamente. La porzione di DNA nella regione di scambio a monte (μ) è unita a quella di ricombinazione a valle permettendo che l'esone VDJ

riarrangiato, subito adiacente alla regione di scambio μ (della cellula B che produce IgM), si ricombini con il gene della catena pesante Ig che si trova immediatamente dopo la regione di scambio, trascrizionalmente attivata, più a valle. Le citochine determinano quale regione C_H debba essere coinvolta nella formazione del trascritto germinativo. Per esempio, l'IL-4 induce la trascrizione del locus I_ε-S_ε-C_ε (Fig. 12-15) e ciò porta dapprima alla produzione di trascritti germinativi ε (in una cellula che produce IgM) e poi alla ricombinazione delle regioni di scambio S_μ e S_ε. La regione di DNA inframmezzata viene persa e l'esone VDJ è portato in prossimità di C_ε. Questo processo determina la produzione di IgE che contengono lo stesso dominio V che era presente nelle IgM originariamente prodotte dalla stessa cellula.

FIGURA 12-15 Meccanismi molecolari dello scambio isotipico delle catene pesanti. Quando i linfociti B attivati dall'antigene vengono stimolati dai linfociti T helper (attraverso CD40L e, nell'esempio qui mostrato, dall'IL-4) subiscono lo scambio verso isotipi di Ig diversi dalle IgM (nell'esempio, verso le IgE). Questi stimoli possono avviare la trascrizione del locus I_ε-S_ε-C_ε, mentre i geni CH prossimali sono eliminati, determinando la ricombinazione dell'esone VDJ con il gene C. Le regioni di scambio sono indicate con circoli denominati S_μ, S_γ e S_ε. I_μ, I_γ e I_ε rappresentano i siti di avvio della trascrizione della linea germinativa. (Si noti che ci sono vari geni Cγ tra le regioni Cδ e Cε e geni Cα a valle di C_ε, non mostrati in figura.)

L'enzima chiave del processo di scambio isotipico (e a quello di maturazione dell'affinità, vedi più avanti) è citidina deaminasi indotta dalla attivazione (*Activation-Induced Deaminase*, AID). Come descritto in precedenza, l'espressione dell'enzima AID è principalmente regolata dai segnali di CD40 attivato dai linfociti T_{FH}. AID agisce catalizzando la deaminazione delle citosine (C) e convertendole a uracile (U) (Fig. 12-16). Le regioni di scambio sono ricche in basi G e C e i trascritti tendono a formare complessi stabili DNA-RNA attraverso la loro catena di DNA codificante e lasciando libera quella non codificante, che forma a sua volta un'ansa a singola elica definita *loop R*. A livello del loop R un elevato numero di residui di citosina è convertito in uracile da AID. Successivamente, un secondo enzima, l'uracil *N*-glicosilasi, rimuove i residui di uracile generando siti privi di basi azotate che vengono

riconosciuti e rimossi da un terzo enzima, l'endonucleasi ApeI (e probabilmente da altri enzimi), che genera delle interruzioni nel DNA. Alcuni tagli vengono prodotti anche nella seconda catena attraverso meccanismi che non sono ancora del tutto noti. I tagli presenti su entrambe le catene contribuiscono alla rottura della doppia elica sia a livello della regione S_{μ} sia in quella di scambio più a valle. Le rotture della doppia elica nelle due regioni di scambio vengono ricongiunte (riparate) ad opera dei meccanismi responsabili della riparazione delle rotture della doppia elica del DNA che agisce unendo le terminazioni non omologhe. In questo processo, il frammento di DNA inframmezzato portando la regione V, originariamente riarrangiata, adiacente alla nuova regione costante, viene eliminato.

FIGURA 12-16 Meccanismi attraverso i quali l'enzima AID e i trascritti germinativi generano rotture della doppia catena di DNA nelle regioni di scambio. I trascritti germinativi delle catene ibride DNA-RNA nella regione di scambio e l'enzima AID catalizzano la deaminazione dei residui di C generando residui di uracile in una singola catena di DNA. L'enzima uracile *N*-glicosilasi (UNG) rimuove i residui di uracile generando i siti abasici dove l'endonucleasi ApeI genera dei tagli che determinano la rottura della doppia catena.

Maturazione dell'affinità anticorpale: mutazioni somatiche a carico dei geni che codificano per le Ig e selezione dei linfociti B ad alta affinità

La maturazione dell'affinità è il processo che porta all'aumento dell'affinità degli anticorpi per un determinato antigene T-dipendente, a mano a mano che la risposta umorale procede. Essa è il risultato di mutazioni somatiche che avvengono a carico dei geni che codificano per le Ig, seguita dalla sopravvivenza selettiva dei linfociti B che, proprio grazie a queste mutazioni, producono gli anticorpi con affinità maggiore. Il processo di maturazione dell'affinità porta alla produzione di anticorpi dotati di affinità sempre maggiore per l'antigene e quindi capaci di neutralizzare microrganismi ed eliminarli sempre più efficacemente (Fig. 12-17). I linfociti T helper e il sistema CD40-CD40L sono necessari affinché il processo di maturazione dell'affinità possa avere luogo, pertanto la maturazione dell'affinità si verifica solo nel corso di risposte anticorpali dirette verso antigeni proteici T-dipendenti.

FIGURA 12-17 Maturazione dell'affinità. All'inizio della risposta umorale vengono prodotti anticorpi dotati di bassa affinità. Nel corso della reazione del centro germinativo, le mutazioni somatiche dei geni V delle Ig e la selezione dei linfociti B, dotati di recettori con maggiore affinità, portano alla produzione di anticorpi a elevata affinità.

Nei linfociti B della zona scura che stanno proliferando, i geni V che codificano per le Ig vanno incontro a mutazioni puntiformi con un'enorme frequenza. Si stima che per ogni divisione cellulare tale frequenza sia pari a 1 mutazione per ogni 10^3 paia di basi del gene V. Tale frequenza è circa 1.000 volte superiore a quella di qualsiasi altro gene di mammifero e per questo motivo viene anche definita **ipermutazione somatica**. I geni V delle catene pesanti o leggere di ciascun linfocita B contengono in totale circa 700 nucleotidi, quindi si può calcolare che in essi si accumulerà circa una mutazione per ogni divisione cellulare. Ne consegue che ciascun clone di linfociti B specifico per un determinato antigene accumulerà sempre più mutazioni durante la propria permanenza nel centro germinativo. In effetti, è stato stimato che le sequenze nucleotidiche codificanti per le IgG di un determinato clone possono raggiungere fino al 5% di divergenza dalla sequenza nucleotidica della linea germinativa. Ciò equivale a più di 10 sostituzioni aminoacidiche. Tali mutazioni presentano alcune importanti caratteristiche: 1) nei segmenti genici V, le mutazioni si concentrano principalmente in corrispondenza delle regioni che determinano la complementarietà (Fig. 12-18); 2) avvengono più mutazioni nelle IgG rispetto alle IgM; 3) la presenza di mutazioni correla con l'aumento dell'affinità degli anticorpi diretti contro l'antigene che ha originato la risposta.

FIGURA 12-18 Mutazioni somatiche a carico dei geni V delle Ig. In questo esperimento sono stati prodotti ibridomi a partire da cellule spleniche di topi immunizzati 7 o 14 giorni prima con un aptene (oxazolone) coniugato a una proteina. Gli ibridomi erano prodotti anche a partire da cellule spleniche ottenute dopo una seconda o terza immunizzazione con lo stesso antigene. Sono stati prodotti ibridomi in grado di produrre anticorpi monoclonali specifici antioxazolone da ciascuna di queste condizioni sperimentali e si è proceduto al sequenziamento dei geni V codificanti per le catene pesanti e leggere delle Ig. Le mutazioni a carico di tali geni si concentrano nelle regioni che determinano la complementarietà (*Complementarity-Determining Regions*, CDR) e aumentano con il tempo in seguito all'immunizzazione e per effetto di immunizzazioni ripetute. La localizzazione della regione CDR3 nelle catene pesanti è approssimativa. Anche l'affinità degli anticorpi prodotti tende ad aumentare con l'aumentare del numero di mutazioni, come indicato dalla costante di dissociazione (K_d) del legame dell'anticorpo all'aptene sempre più bassa. *(Modificata da Berek C, Milstein C: Mutation drift and repertoire shift in maturation of the immune response, Immunological Reviews 96:23-41, 1987, Blackwell Publishing.)*

I meccanismi alla base del processo di ipermutazione somatica che avviene a carico dei geni che codificano per le Ig sono solo parzialmente noti. Il fatto che il segmento VDJ riarrangiato diventi altamente suscettibile a mutazioni suggerisce un aumento della probabilità che questa regione venga riconosciuta dai fattori in grado di legare le regioni V del DNA riarrangiato per introdurre mutazioni. L'enzima AID, già descritto precedentemente nell'ambito dello scambio isotipico, svolge un ruolo essenziale anche nella maturazione dell'affinità. AID è una DNA-deaminasi che converte in uracile i residui di citosina, presenti in sequenze di DNA particolarmente importanti (*hotspot*) per le mutazioni. Durante la duplicazione del DNA, l'uracile viene generalmente sostituito con timidina, generando così mutazioni C:T. In alternativa, l'uracile può venire eliminato a opera dall'enzima uracil *N*-glicosilasi e il sito corrispondente riparato da un sistema predisposto a generare errori ai siti di deaminazione. Questo processo di errori e riparazione estende la sequenza di mutazioni anche oltre i residui C che sono oggetto dell'azione dell'enzima AID.

La ripetuta stimolazione da parte di antigeni proteici T-dipendenti determina nei linfociti B antigene-specifici del centro germinativo un aumento del numero di mutazioni a carico dei geni che codificano per le Ig. Alcune di queste mutazioni risulteranno "utili", poiché daranno origine ad anticorpi a maggiore affinità. È tuttavia verosimile che molte delle mutazioni genereranno una riduzione o persino la perdita della capacità dell'anticorpo di legare l'antigene. Ne deriva la necessità di una tappa successiva, durante la quale avvenga la selezione positiva dei linfociti B che producono anticorpi

ad alta affinità, un tipo di selezione naturale di tipo darwiniano che garantisce la sopravvivenza solo dei linfociti B migliori (più adatti in termini di legame all'antigene).

I linfociti B che nel centro germinativo legano gli antigeni con elevata affinità hanno un vantaggio selettivo di sopravvivenza (Fig. 12-19). Nelle fasi precoci della risposta immunitaria gli anticorpi prodotti possono formare complessi con l'antigene e attivare il complemento. Le FDC esprimono recettori sia per il frammento Fc sia per frammenti del complemento, come C3b e C3d, tramite i quali possono legare sulla loro superficie l'antigene complessato con anticorpi o con frammenti del complemento. Inoltre, l'antigene può essere presente nel centro germinativo anche in forma solubile. Parallelamente, i linfociti B del centro germinativo che hanno subito il processo di ipermutazione somatica migrano nella zona chiara ricca di FDC. Questi linfociti B moriranno per apoptosi, a meno che riescano a riconoscere l'antigene. I linfociti B dotati di recettori a elevata affinità riescono a legare l'antigene anche quando questo è presente a basse concentrazioni, ricevendone un segnale di sopravvivenza. Tale processo avviene tramite diversi meccanismi: 1) il riconoscimento dell'antigene induce di per sé l'espressione di proteine antiapopototiche della famiglia di Bcl-2; 2) i linfociti B dotati di elevata affinità per l'antigene saranno avvantaggiati nel processo di endocitosi e presentazione dell'antigene ai pochi linfociti T_{FH} presenti nel centro germinativo, che a loro volta promuoveranno la sopravvivenza delle cellule B attraverso il loro CD40L di membrana; 3) alcuni linfociti T_{FH} esprimono il ligando del recettore Fas, che può riconoscere il Fas espresso dai linfociti B, inducendone la morte per apoptosi. I linfociti B ad alta affinità, che sono avvantaggiati a riconoscere e rispondere all'antigene, sono in grado di attivare inibitori endogeni del recettore Fas e proteggersi dalla morte a cui sono invece destinati quelli a bassa affinità.

FIGURA 12-19 Selezione dei linfociti B nel centro germinativo. Le mutazioni somatiche dei geni V dei linfociti B del centro germinativo generano anticorpi dotati di diversa affinità per l'antigene. Il legame all'antigene esposto sulle cellule dendritiche follicolari (FDC) è necessario ai linfociti B per non andare incontro ad apoptosi. Nel centro germinativo, i linfociti B possono inoltre presentare l'antigene ai linfociti T_{FH} che, a loro volta, favoriscono la sopravvivenza dei linfociti B. Attraverso questo meccanismo, i linfociti B dotati di maggiore affinità per l'antigene avranno un vantaggio selettivo per la sopravvivenza, che diviene sempre più importante a mano a mano che la quantità di antigene disponibile diminuisce. Questa competizione sempre più stringente porta a un aumento medio dell'affinità degli anticorpi per l'antigene con il progredire della risposta immunitaria umorale.

A mano a mano che la risposta immunitaria si sviluppa, viene eliminato un numero crescente di antigeni, con la conseguente riduzione della loro concentrazione a livello del centro germinativo. Ne consegue che solo i linfociti B che esprimono recettori per l'antigene con affinità sempre maggiore potranno legare l'antigene ed essere risparmiati dall'apoptosi. Durante lo svolgersi della risposta anticorpale, i linfociti B dotati di affinità sempre maggiore verranno quindi selezionati; tale processo è responsabile della maturazione dell'affinità della risposta anticorpale; tuttavia, dato che molte delle mutazioni somatiche non producono recettori ad alta affinità, queste cellule non saranno selezionate per la sopravvivenza. Per questa ragione, i centri germinativi sono un luogo di frequente apopotosi cellulare.

Le mutazioni somatiche avvengono nei centroblasti della zona scura, caratterizzati dall'espressione nucleare dell'enzima AID. Queste cellule migrano ripetutamente dalla zona scura verso la zona chiara, dove si differenziano in centrociti. I centrociti dotati di recettore con elevata affinità vengono selezionati con l'aiuto dei linfociti T_{FH} e possono andare incontro a un ulteriore scambio isotipico. Le cellule fuoriescono poi dal centro germinativo, trasformandosi in linfociti B della memoria o in precursori delle plasmacellule secernenti anticorpi ad alta affinità.

Le rotture del DNA associate a ipermutazioni somatiche e al processo di scambio isotipico facilitano i processi di traslocazione cromosomica di vari oncongeni nei loci delle Ig, producendo i tumori dei linfociti B (linfomi). Questo spiega il motivo per cui molti linfomi si sviluppano a partire dai linfociti B dei centri germinativi. I centri germinativi possono inoltre contribuire alla patogenesi dell'autoimmunità nel caso che la mutazione somatica origini cloni dei linfociti B fortemente auto-reattivi.

Differenziazione dei linfociti B in plasmacellule secernenti anticorpi

Le plasmacellule sono linfociti B, differenziati terminalmente, morfologicamente distinti, destinati alla produzione di grandi quantità di anticorpi (vedi Cap. 2). Esse si generano in seguito all'attivazione dei linfociti B da parte di BCR, CD40, TLR e di altri recettori, inclusi quelli per le citochine.

Esistono due tipi di plasmacellule: quelle a breve sopravvivenza e quelle a lunga sopravvivenza.

- Le prime originano nei foci extrafollicolari nel corso delle risposte T-indipendenti e durante le fasi precoci delle risposte T-dipendenti per poi localizzarsi negli organi linfoidi secondari e negli organi non linfoidi periferici.
- Le plasmacellule a lunga sopravvivenza vengono generate in risposta ad antigeni proteici, durante la reazione del centro germinativo. A questo processo cooperano l'attivazione del BCR e del recettore di IL-21. Le plasmacellule (e i loro precursori, i **plasmablasti**) si trovano principalmente nel circolo ematico, dove possono essere identificate come linfociti che secernono anticorpi e che hanno perso l'espressione di CD20, un marker dei linfociti B maturi. I plasmablasti generati nei centri germinativi entrano in circolo e si dirigono verso il midollo osseo, dove si differenziano in plasmacellule a lunga sopravvivenza. La sopravvivenza di queste plasmacellule viene sostenuta da citochine della famiglia della citochina BAFF che legano il recettore BCMA permettendo loro di sopravvivere per lunghi periodi, spesso anche per tutta la vita dell'individuo. Generalmente nelle 2-3 settimane successive all'immunizzazione con un antigene T-dipendente, il midollo osseo costituisce la sede principale della produzione anticorpale. Le plasmacellule midollari possono continuare a secernere anticorpi per mesi o persino per anni dopo l'eliminazione dell'antigene. Tali anticorpi sono quelli che forniscono una protezione immediata nel caso di una riesposizione all'antigene. È stato stimato che quasi la metà degli anticorpi normalmente presenti nel sangue di un individuo adulto sia prodotta da plasmacellule a lunga sopravvivenza e sia specifica per gli antigeni con i quali l'individuo è venuto in contatto. Infine, è importante notare come gli anticorpi secreti raggiungano il circolo

ematico e le secrezioni degli organi mucosi, mentre le plasmacellule non migrano attivamente.

Il processo di differenziazione che porta alla generazione di linfociti B che secernono anticorpi è caratterizzato da profonde alterazioni a carico di componenti del reticolo endoplasmatico e dell'apparato di secrezione. Questo processo comporta anche un aumento della produzione di Ig e il passaggio delle Ig dalla forma di membrana a quella secreta. La cellula aumenta in modo considerevole le sue dimensioni e al microscopio è possibile osservare un notevole aumento del rapporto tra l'area del citoplasma e il nucleo (vedi Fig. 2-8). Il reticolo endoplasmatico diventa prominente e la cellula acquisisce capacità secretorie assumendo un aspetto alquanto differente da un linfocita B. Buona parte di queste alterazioni sono maggiormente evidenti nella transizione tra plasmablasto a plasmacellula matura.

Il cambiamento della produzione di Ig dalla forma di membrana (caratteristica dei linfociti B) a quella secreta (caratteristica delle plasmacellule) deriva da cambiamenti nell'estremità carbossiterminale delle catene pesanti delle Ig (Fig. 12-20). Per esempio, nelle catene μ di membrana, il dominio $C_{\mu}4$ è seguito da una breve sequenza di 26 aminoacidi idrofobici e da una coda intracitoplasmatica di soli 3 aminoacidi (lisina, valina e lisina). Al contrario, nelle IgM secrete, il dominio $C_{\mu}4$ è seguito da una coda di aminoacidi polari. La transizione da Ig di membrana a Ig secrete è il risultato di splicing alternativo dell'mRNA codificante per le catene pesanti. Nei linfociti B che producono IgM, tutti i trascritti primari contengono il segmento VDJ riarrangiato, i 4 esoni C_{μ} codificanti per i domini della regione costante (C) e i 2 esoni codificanti rispettivamente per il dominio transmembrana e per quello intracitoplasmatico. La processazione (*splicing*) alternativa di questo trascritto, regolato dal sito di taglio dell'RNA e dalla selezione dei siti di poliadenilazione, condiziona l'inclusione o meno dei due esoni che codificano per il dominio transmembrana e intracitoplasmatico nell'mRNA maturo: se essi rimangono, la catena μ prodotta conterrà gli aminoacidi che costituiscono il segmento transmembrana e intracitoplasmatico, restando perciò ancorata al doppio strato lipidico della membrana plasmatica. Se invece il segmento transmembrana viene escluso, l'estremità carbossiterminale della catena μ

consisterà solo dei circa 20 aminoacidi della porzione di coda. Non possedendo la sequenza di aminoacidi idrofobici, la catena μ (e l'anticorpo di cui essa fa parte) non resterà quindi ancorata alla membrana del reticolo endoplasmatico, venendo alla fine liberata nello spazio extracellulare. Quindi, ciascun linfocita B è in grado di sintetizzare sia Ig di membrana sia Ig di secrezione. In una plasmacellula, la maggiore parte dell'mRNA viene tagliato al sito di poliadenilazione collocato a monte, per cui la maggior parte dell'mRNA è prodotto nella sua forma secretoria. Tutti i geni C_H contengono esoni di membrana simili e di conseguenza, potenzialmente, tutte le catene pesanti possono essere espresse nelle loro forme di membrana o secrete. La forma secretoria della catena δ viene tuttavia prodotta raramente, cosicché le IgD sono solitamente presenti solo nella loro forma recettoriale di membrana.

FIGURA 12-20 Produzione di catene μ di membrana o secrete da parte dei linfociti B. La processazione alternativa del trascritto primario dell'RNA porta alla formazione di mRNA codificanti per la forma di membrana o secretoria della catena pesante μ. La differenziazione dei linfociti B si accompagna all'aumento della produzione di catene m di secrezione. TP, TM e CY indicano la porzione di coda, il segmento transmembrana e la porzione intracitoplasmatica, rispettivamente. $C_\mu 1$, $C_\mu 2$, $C_\mu 3$ e $C_\mu 4$ rappresentano i quattro esoni del gene C_μ.

Generazione di linfociti B della memoria

I linfociti B della memoria sono generati durante la reazione del centro germinativo e sono in grado di produrre rapide risposte a un'eventuale riesposizione all'antigene. Dato che le cellule della memoria vengono generate principalmente nei centri germinativi, esse sono parte delle risposte T-dipendenti e generalmente originano insieme ai linfociti T helper della memoria. Alcuni linfociti B attivati nei centri germinativi acquisiscono la capacità di sopravvivere per lunghi periodi, apparentemente in assenza di stimolazione da parte dell'antigene. Questi linfociti B della memoria esprimono elevati livelli della proteina antiapoptotica Bcl-2, che contribuisce alla loro sopravvivenza a lungo termine. Alcuni linfociti B della memoria restano negli organi linfoidi dove si sono generati, mentre altri abbandonano i centri germinativi e ricircolano tra il sangue e gli organi linfoidi. Rispetto ai linfociti B naïve, i linfociti B della memoria esprimono un BCR ad alta

affinità (poiché ipermutati) e isotipi diversi dalle IgM (poiché hanno subito lo scambio isotipico). La produzione di grandi quantità di anticorpi ad alta affinità di diversi isotipi viene notevolmente accelerata in seguito a successive esposizioni all'antigene e ciò può essere attribuito all'attivazione delle cellule della memoria dei centri germinativi.

Molte delle caratteristiche che differenziano le risposte anticorpali secondarie (cioè della memoria) da quelle primarie (vedi Fig. 12-2) sono dovute alle diverse risposte dei linfociti B della memoria rispetto a quelli naïve.

Ne consegue che, per essere efficace, un vaccino diretto contro un microrganismo o una tossina batterica deve essere in grado di indurre sia la maturazione dell'affinità sia la generazione dei linfociti B della memoria, che a loro volta avvengono solo se il vaccino è in grado di attivare i linfociti T helper. Questo concetto è stato applicato allo sviluppo di vaccini contro alcune infezioni batteriche, in cui l'antigene bersaglio è un polisaccaride capsulare, incapace di stimolare i linfociti T. Per questa ragione, il polisaccaride viene legato covalentemente a una proteina, in modo da formare l'equivalente di un coniugato aptene-carrier in grado di attivare i linfociti T helper. Tali vaccini, che vengono definiti **vaccini coniugati**, inducono la produzione di anticorpi dotati di maggiore affinità e una più rapida generazione di linfociti B della memoria. I vaccini coniugati si sono dimostrati in grado di indurre una risposta protettiva specialmente nei neonati e nei bambini, che sono meno efficienti di un soggetto adulto nell'attivare una risposta T-dipendente.

Ruolo dei fattori di trascrizione nell'attivazione dei linfociti B

Le conseguenze funzional della differenziazione B dipendono dall'attivazione di diversi fattori di trascrizione. Da quanto visto finora, emerge che i linfociti B attivati possono seguire diverse strade. Possono diventare plasmacellule a breve o a lunga sopravvivenza, che producono elevati livelli di anticorpi, oppure possono dare luogo a cellule della memoria a lunga sopravvivenza, che non producono anticorpi ma sopravvivono per lunghi periodi, pronte a rispondere rapidamente in seguito al riconoscimento dell'antigene. Nel Capitolo 10 abbiamo visto come le risposte T dipendano in ampia misura dall'espressione di vari fattori di

trascrizione e di repressori della trascrizione. Questo stesso principio si applica alla differenziazione dei linfociti B. I principali fattori di trascrizione coinvolti nella definizione del destino dei linfociti B dei centri germinativi sono i seguenti:

- ***Bcl-6***. Nei centri germinativi, i segnali attivati da CD40 e dal recettore dell'IL-21 inducono l'espressione di un repressore della trascrizione chiamato Bcl-6 che funge da repressore trascrizionale ed è responsabile del progredire della reazione del centro germinativo, in modo particolare della grande proliferazione che caratterizza i linfociti B. Bcl-6 sopprime l'espressione degli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti e quindi coopera con gli attivatori trascrizionali, quali c-Myb, orchestrando il rapido ingresso nel ciclo cellulare dei linfociti B dei centri germinativi. Bcl-6 sopprime inoltre p53, un fattore di trascrizione che determina l'arresto del ciclo cellulare e la morte per apoptosi in seguito a danno del DNA. Di conseguenza, i centroblasti possono tollerare il danno al DNA che accompagna l'ipermutazione somatica e lo scambio isotipico senza andare incontro a apoptosi. Bcl-6 antagonizza un altro repressore trascrizionale, chiamato **Blimp-1**, che è richiesto per lo sviluppo delle plasmacellule (vedi più avanti) e quindi impedisce alle cellule del centro germinativo di differenziarsi in plasmacellule durante la fase di grande proliferazione che caratterizza la reazione del centro germinativo.
- ***Blimp-1 e IRF4.*** Blimp-1, un repressore trascrizionale, e IRF4, un attivatore trascrizionale, sono indotti in alcuni dei linfociti B attivati e determinano la loro differenziazione a plasmacellule. Oltre a sopprimere Bcl-6, Blimp-1 sopprime un secondo fattore di trascrizione, Pax5, necessario per la sopravvivenza dei linfociti B maturi. Ciò significa che Blimp-1 permette lo sviluppo delle plasmacellule. IRF4 contribuisce all'espressione di XBP-1, un fattore trascrizionale che svolge un ruolo fondamentale nella risposta alle proteine che hanno una conformazione alterata. XBP-1 protegge le plasmacellule dai danni causati dalle proteine che hanno un'errata conformazione (un evento associato all'enorme aumento della sintesi proteica) e contribuisce alla maturazione delle plasmacellule e all'aumento della sintesi di Ig.

- Non sono ancora stati individuati i fattori trascrizionali responsabili dello sviluppo delle cellule della memoria. Sembra tuttavia che una parte della progenie del clone delle cellule stimolate esprima bassi livelli di IRF4 e questo sia associato a uno stato funzionale di quiescenza, in cui le cellule sono in grado di duplicarsi e di assumere le caratteristiche delle cellule della memoria a lunga sopravvivenza. Quindi, mentre elevati livelli di IRF4 indirizzano la cellula verso la differenziazione a plasmacellula, livelli più bassi sarebbero insufficienti per attivare i linfociti B e potrebbero permettere la generazione di linfociti B della memoria.

RISPOSTE ANTICORPALI AGLI ANTIGENI T-INDIPENDENTI

Molti antigeni non proteici, come i polisaccaridi e i lipidi, stimolano la produzione di anticorpi in assenza del coinvolgimento dei linfociti T helper. Tali antigeni sono denominati antigeni timo-indipendenti (T-indipendenti o TI). Le risposte anticorpali agli antigeni TI differiscono sotto molti aspetti da quelle verso gli antigeni proteici T-dipendenti (Tab. 12-2). Gli anticorpi prodotti in assenza della cooperazione dei linfociti T sono generalmente caratterizzati da una bassa affinità e sono rappresentati principalmente da IgM, con un modesto scambio isotipico verso le IgG e le IgA.

TABELLA 12-2 Proprietà degli antigeni timo-dipendenti e timo-indipendenti

	Antigeni timo-dipendenti	Antigeni timo-indipendenti
Natura chimica	Proteine	Antigeni polimerici: in particolare polisaccaridi ma anche glicolipidi e acidi nucleici
Caratteristiche della risposta anticorpale		
Scambio isotipico	Sì; IgG, IgE, e IgA	Assente o scarso (forse alcune IgG e IgA)
Maturazione dell’affinità	Sì	No

Risposta secondaria (linfociti B della memoria)	Sì	Solo con alcuni antigeni (per esempio polisaccaridi)

Tipi di linfociti B che rispondono agli antigeni T-indipendenti

Il linfociti B della zona marginale e quelli B-1 svolgono un ruolo importante nella risposta agli antigeni TI. Se i linfociti B follicolari sono principalmente responsabili delle risposte verso antigeni proteici T-dipendenti, altri tipi di linfociti B sono invece coinvolti nelle risposte agli antigeni TI (vedi Fig. 12-3). I linfociti B della zona marginale rappresentano una sottopopolazione distinta che risponde principalmente ai polisaccaridi e si differenzia in plasmacellule a breve sopravvivenza che producono IgM. I linfociti B-1 rappresentano un altro tipo di linfociti B, sono localizzate nel peritoneo e nelle mucose e rispondono rapidamente agli antigeni TI.

Le risposte anticorpali agli antigeni TI si generano a livello della milza, del midollo osseo, della cavità peritoneale e delle mucose. I macrofagi localizzati nelle zone marginali dei follicoli della milza sono particolarmente efficienti nel captare i polisaccaridi presenti in circolo. Gli antigeni TI possono persistere per lunghi periodi sulla superficie dei macrofagi della zona marginale, dove possono essere riconosciuti dai linfociti B specifici.

Meccanismi delle risposte T-indipendenti

Gli antigeni T-indipendenti sono in grado di stimolare la proliferazione e la differenziazione dei linfociti B senza l'aiuto dei linfociti T. I più importanti antigeni TI sono i polisaccaridi, i glicolipidi e gli acidi nucleici, tutti in grado di indurre la produzione di Ig specifiche anche in animali con deficit a carico dei linfociti T. Questi antigeni non possono essere processati e presentati in associazione a molecole MHC e pertanto non possono essere riconosciuti dai linfociti T helper $CD4^+$. La maggior parte degli antigeni TI è costituita da molecole polivalenti composte da molteplici epitopi antigenici identici e ripetuti, in grado di promuovere efficientemente l'aggregazione delle Ig di membrana; ciò permette l'attivazione di queste cellule anche in assenza dei linfociti T. Inoltre, molti polisaccaridi attivano il sistema del complemento attraverso la via alternativa, generando il frammento C3d, che si lega all'antigene e può essere riconosciuto dal recettore CR2,

promuovendo l'attivazione dei linfociti B (vedi Fig. 12-5). Le proteine espresse a elevati livelli sulla membrana microbica, possono essere multivalenti e agire in modo sia T-indipendente sia T-dipendente. Come già detto, le risposte TI possono essere facilitate anche da altri segnali accessori come quelli generati dall'attivazione dei TLR espressi dai linfociti B da parte dei prodotti microbici.

Alcuni antigeni TI non proteici inducono la produzione di Ig diverse dalle IgM, nonostante le risposte TI non siano caratterizzate da scambio isotipico. Nell'uomo, la principale classe di anticorpi prodotti in risposta al polisaccaride capsulare dello pneumococco è l'IgG2. Nei topi knockout per CD40, i livelli di IgE e di molte classi di IgG sono appena misurabili nel siero, mentre le IgA e le IgG3 (corrispondenti alle IgG2 umane) sono diminuite solo di circa la metà rispetto ai loro livelli normali. Le citochine prodotte da cellule diverse dai linfociti T possono stimolare lo scambio di classe verso gli antigeni TI. Come precedentemente descritto, in assenza di linfociti T, le citochine BAFF e APRIL prodotte da cellule di origine mieloide, quali le cellule dendritiche e i macrofagi, possono indurre la sintesi dell'enzima AID attraverso il recettore TACI della famiglia dei recettori della citochina BAFF. A ciò può peraltro contribuire l'attivazione dei TLR. Inoltre, le citochine come il TGF-β, secrete da diverse cellule non linfoidi delle mucose, facilitano lo scambio di classe verso la produzione di IgA dirette contro antigeni non proteici (vedi Cap. 14).

Protezione mediata da anticorpi T-indipendenti

L'importanza biologica degli antigeni TI risiede nel fatto che molti polisaccaridi che compongono la parete cellulare batterica appartengono a questa categoria e che l'immunità umorale rappresenta il principale meccanismo di difesa dell'ospite verso le infezioni da parte di questi microrganismi. Per questa ragione, gli individui con deficit congeniti o acquisiti dell'immunità umorale sono particolarmente sensibili alle infezioni da parte di batteri capsulati, come lo pneumococco, il meningococco ed *Haemophilus*.

Gli antigeni TI contribuiscono inoltre a stimolare la produzione di **anticorpi naturali**, presenti fisiologicamente in circolo e apparentemente prodotti senza un'evidente esposizione all'antigene. La maggior parte di

queste Ig è rappresentata da anticorpi a bassa affinità diretti contro i carboidrati, probabilmente prodotti dai linfociti B-1 peritoneali, stimolati dai batteri che colonizzano il tratto gastrointestinale e dai linfociti B della zona marginale della milza. Sia nell'uomo sia nel topo, una notevole quantità di anticorpi naturali riconosce lipidi ossidati come la lisofosfatidilcolina e la fosforilcolina, presenti nelle membrane batteriche e nelle cellule apoptotiche ma non presenti sulla superficie esterna della membrana delle cellule sane. Osservazioni sperimentali indicano che gli anticorpi naturali specifici per questi fosfolipidi proteggono dalle infezioni batteriche e facilitano la fagocitosi delle cellule apoptotiche. Gli anticorpi anti-ABO sono un ulteriore esempio di anticorpi naturali: essi riconoscono particolari glicolipidi (detti antigeni di gruppo ematico) espressi sulla superficie degli eritrociti e di molti altri tipi cellulari. Questi antigeni e anticorpi sono importanti per il rigetto dei trapianti ma non per la difesa dai patogeni e saranno discussi nel Capitolo 17.

Nonostante la loro incapacità di attivare direttamente i linfociti T, molti vaccini diretti contro i polisaccaridi, tra i quali il vaccino antipneumococco, inducono una protezione a lungo termine. Infatti, in risposta a esposizioni ripetute ad antigeni carboidrati si osservano risposte secondarie rapide e imponenti (tipiche della memoria immunitaria, ma prive di evidenti scambi di classe o di maturazione dell'affinità).

FEEDBACK ANTICORPALE: REGOLAZIONE DELLE RISPOSTE IMMUNITARIE UMORALI DA PARTE DEI RECETTORI Fc

Gli anticorpi secreti formano immunocomplessi che vanno a legare simultaneamente le Ig di membrana e i recettori Fcγ espressi dai linfociti B, inibendone l'attivazione (Fig. 12-21). Questo fenomeno, definito **feedback anticorpale**, spiega l'osservazione che le IgG secrete inibiscono la sintesi di nuovi anticorpi. Le IgG bloccano l'attivazione dei linfociti B formando dei complessi con l'antigene che si possono legare a un FcR delle IgG, denominato recettore FcγRIIB o CD32. (I recettori Fc saranno trattati nel Cap. 13). Il dominio citoplasmatico di questo recettore contiene un dominio inibitorio ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*) (vedi Cap. 7). Quando il recettore Fcγ del linfocita B viene legato dall'immunocomplesso, il dominio ITIM viene fosforilato nei residui di

tirosina, formando un sito di attacco per l'inositolo-5-fosfatasi SHIP (*SH2 domain-containing Inositol Phosphatase*). Una volta reclutata, la fosfatasi SHIP idrolizza un gruppo fosfato presente nel fosfatidilinositolo trifosfato (PIP3), inattivandone le funzioni. Attraverso questo meccanismo, l'attivazione di FcγRIIB blocca la risposta del linfocita B all'antigene. Va infine osservato che, poiché gli immunocomplessi interagiscono simultaneamente sia con il recettore per l'antigene (attraverso quest'ultimo) sia con FcγRIIB (attraverso l'anticorpo), le fosfatasi inibitorie vengono portate in prossimità dei recettori per l'antigene la cui trasduzione del segnale viene bloccata più efficientemente.

FIGURA 12-21 Regolazione dell'attivazione dei linfociti B da parte di FcγRIIB. A. Gli immunocomplessi possono legarsi simultaneamente alle Ig di membrana (mediante l'antigene) e a FcγRIIB (mediante la porzione Fc dell'anticorpo). **B.** In conseguenza di questi legami simultanei, le fosfatasi associate alla coda citoplasmatica di FcγRIIB inibiscono la trasduzione del segnale da parte del complesso BCR, bloccando l'attivazione dei linfociti B.

Il feedback anticorpale da parte dei FcR è un meccanismo fisiologico di controllo delle risposte umorali, poiché è direttamente stimolato dalla produzione di anticorpi e ne blocca l'ulteriore produzione. Non bisogna però dimenticare che, come già visto precedentemente, gli anticorpi possono anche amplificare la loro stessa produzione attivando il complemento e generando il frammento C3d. Non è chiaro in quali circostanze gli anticorpi amplifichino la loro produzione attraverso il complemento o la inibiscano attraverso FcR. È possibile che durante le fasi precoci delle risposte immunitarie umorali, le IgM (che attivano il complemento ma non legano FcγR) inducano preferenzialmente l'amplificazione, mentre la produzione sempre maggiore di IgG nelle fasi più tardive sia responsabile del feedback inibitorio.

L'importanza dell'inibizione da parte di FcγRIIB è dimostrata dall'abnorme e incontrollata produzione di anticorpi che si osserva nei topi knockout per il gene che codifica per *FcγRIIB*. Inoltre, un polimorfismo nello stesso gene nell'uomo è stato associato all'aumentata incidenza di lupus eritematoso sistemico.

I linfociti B esprimono un ulteriore recettore inibitorio chiamato CD22, che è una lectina che lega l'acido sialico. In verità, il suo ligando naturale

non è conosciuto e non è noto come esso venga coinvolto durante le risposte dei linfociti B. I topi knockout per il CD22 mostrano tuttavia un'abnorme attivazione dei linfociti B. Il dominio citoplasmatico del CD22 contiene una sequenza ITIM che, quando viene fosforilata dalla chinasi Lyn, un membro della famiglia delle Src, lega il dominio SH2 della tirosina fosfatasi SHP-1 che a sua volta rimuove i gruppi fosfato dai residui di tirosina di diversi enzimi e proteine adattatrici coinvolti nella trasduzione del segnale del BCR, inibendo l'attivazione dei linfociti B. Un ceppo murino denominato *motheaten*, caratterizzato da gravi manifestazioni autoimmuni, abnorme produzione di autoanticorpi e incontrollata attivazione dei linfociti B, presenta una mutazione genetica spontanea nel gene che codifica proprio per la SHP-1. La delezione condizionale della fosfatasi SHP-1 e la rimozione genetica della chinasi Lyn nei linfociti B determinano la rottura della tolleranza periferica B e lo sviluppo dell'autoimmunità.

RIEPILOGO

* Nelle risposte umorali, i linfociti B vengono attivati dall'antigene e secernono anticorpi deputati all'eliminazione dell'antigene stesso. Sia gli antigeni proteici sia quelli non proteici possono stimolare risposte anticorpali. Le risposte dei linfociti B agli antigeni proteici richiedono la cooperazione dei linfociti T helper $CD4^+$ specifici per l'antigene.
* Le risposte dei linfociti B agli antigeni proteici T-dipendenti presuppongono l'attivazione contemporanea dei linfociti T naïve nelle aree T e dei linfociti B nei follicoli degli organi linfoidi. I linfociti attivati migrano uno verso l'altro e interagiscono tra loro ai margini dei follicoli, dove i linfociti B presentano l'antigene ai linfociti T helper.
* I linfociti T helper attivati esprimono CD40L che si lega a CD40 espresso dai linfociti B. Inoltre, i linfociti T attivati secernono citochine che vanno a legarsi ai loro recettori espressi dai linfociti B. La combinazione dei segnali generati da CD40 e dalle citochine stimola la proliferazione e la differenziazione iniziale dei linfociti B.
* La stimolazione dei linfociti B extrafollicolari da parte dei linfociti T determina la formazione di foci extrafollicolari, sede di un limitato processo di scambio isotipico e della generazione di plasmacellule a breve sopravvivenza.
* Alcuni linfociti T helper si differenziano in cellule T_{FH} che esprimono elevati livelli di ICOS e di CXCR5 e producono l'IL-21. I linfociti T_{FH} e i linfociti B attivati migrano nei follicoli e i T_{FH} stimolano la formazione dei centri germinativi a opera dei linfociti B specifici. I centri germinativi sono la sede dei processi che caratterizzano le fasi tardive delle risposte verso antigeni T-dipendenti, come lo scambio di classe, le mutazioni somatiche, la maturazione dell'affinità, la generazione delle cellule della memoria e delle plasmacellule a lunga sopravvivenza.
* I segnali che derivano dai linfociti T helper (tra i quali CD40L e le citochine) inducono nei linfociti B lo scambio isotipico mediante un processo, definito ricombinazione per scambio, che porta alla produzione di vari isotipi di Ig. Tali processi richiedono l'induzione

dell’enzima AID, una citosina deaminasi che trasforma la citosina in uracile nel DNA a singola catena. Parallelamente, diverse citochine regolano l’accesso di AID in distinti loci codificanti per le catene pesanti.

* Il processo di maturazione dell’affinità avviene nei centri germinativi in risposta agli antigeni T-dipendenti e determina la produzione di anticorpi con affinità sempre maggiore. Questo processo è il risultato dell’ipermutazione somatica che avviene a carico dei geni che codificano per le catene pesanti e leggere delle Ig, seguita dalla sopravvivenza selettiva dei linfociti B che producono anticorpi a più elevata affinità e che quindi si legano con maggiore efficienza all’antigene presentato dalle cellule dendritiche follicolari nei centri germinativi. I linfociti T_{FH} partecipano al processo di selezione dei linfociti B che producono anticorpi dotati di elevata affinità.
* Una parte della progenie dei linfociti B dei centri germinativi si differenzia in cellule secernenti anticorpi che migrano nel midollo osseo. Un’altra parte si trasforma in cellule della memoria capaci di sopravvivere per lunghi periodi, ricircolando tra linfonodi e milza. Queste cellule rispondono con rapidità ed efficienza a ogni successiva esposizione all’antigene differenziandosi in cellule secernenti anticorpi ad alta affinità. L’espressione di diversi fattori di trascrizione controlla il differenziamento di un linfocita B in plasmacellula o in cellule della memoria.
* Gli antigeni timo-indipendenti (TI) sono generalmente antigeni non proteici che inducono risposte immunitarie umorali senza il coinvolgimento dei linfociti T helper. Molti antigeni TI, tra cui i polisaccaridi, i glicolipidi e gli acidi nucleici, sono polivalenti e perciò causano efficientemente l’aggregazione delle Ig di membrana del linfocita B. Inoltre, essi attivano il complemento, riuscendo quindi a stimolare i linfociti B senza il coinvolgimento dei linfociti T. L’attivazione dei TLR da parte di componenti microbiche facilita l’attivazione dei linfociti B in assenza dell’intervento dei linfociti T. Nelle risposte anticorpali agli antigeni TI sono assenti o estremamente limitati i processi di scambio isotipico, di maturazione dell’affinità e di generazione di linfociti B della memoria. Ciò avviene poiché queste caratteristiche dipendono dai linfociti T helper che, come già ricordato, non vengono attivati dagli antigeni non proteici. La stimolazione dei TLR da parte dei microbi può tuttavia determinare la produzione di citochine della famiglia del TNF che attivano AID, determinando l’attivazione di un limitato processo di scambio di classe.
* Il feedback anticorpale è il principale meccanismo attraverso il quale le risposte immunitarie umorali vengono terminate una volta che sia stata prodotta una sufficiente quantità di anticorpi. Gli anticorpi formano immunocomplessi che, sulla superficie dei linfociti B, legano simultaneamente il BCR e FcR delle IgG (FcγRIIB), avvicinandoli. Attraverso la coda citoplasmatica di quest’ultimo, si attiva una cascata di segnali inibitori che portano allo spegnimento della trasduzione del segnale da parte del BCR e al conseguente blocco dell’attivazione del linfocita B.

LETTURE CONSIGLIATE

Sottopopolazioni di cellule B e attivazione dei linfociti B

Cerutti A.; Cols M.; Puga I: Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nature Reviews Immunology* 13:118–132 (2013).

Gonzalez S.F.; Degn S.E.; Pitcher L.A.; Woodruff M.; Heesters B.A.; Carroll M.C: Trafficking of B cell antigen in lymph nodes. *Annual Review of Immunology* 29:215–233 (2011).

Goodnow C.C.; Vinuesa C.G.; Randall K.L.; Mackay F.; Brink R: Control systems and decision making for antibody production. *Nature Immunology* 11:681–688 (2010).

Martin F.; Chan A.C: B cell immunobiology in disease: evolving concept from the clinic. *Annual Review of Immunology* 24:467–496 (2006).

Mauri C.; Bosma A: Immune regulatory function of B cells. *Annual Review of immunology* 30:221–241 (2012).

Rickert R.C: New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell malignancies. *Nature Reviews Immunology* 13:578–591 (2013).

Yuseff M.I.; Pierobon P.; Reversat A.; Lennon-Dumenil A.M: How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nature Reviews Immunology* 13:475–486 (2013).

Linfociti T helper follicolari e reazione dei centri germinativi

Crotty S.. Follicular helper CD4 T cells. *Annual Review of Immunology* 29:621–663 (2011).

Crotty S.; Johnston R.J.; Schoenberger S.P: Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nature Immunology* 11:114–120 (2010).

McHeyzer-Williams M.; Okitsu S.; Wang N.; McHeyzer-Williams L: Molecular programming of B cell memory. *Nature Reviews lmmunology* 12:24–34 (2012).

Tangye S.G.; Ma C.S.; Brink R.; Deenick E.K: The good, the bad and the ugly - T_{FH} cells in human health and disease. *Nature Reviews Immunology* 13:412–426 (2013).

Victora G.D.; Nussenzweig M.C: Germinal centers. *Annual Review of Immunology* 30:429–457 (2012).

Vinuesa C.G.; Sanz I.; Cook M.C: Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nature Reviews Immunology* 9:845–857 (2009).

AID, cambio di classe e mutazione somatica

Cerutti A.. The regulation of IgA class switching. *Nature Reviews Immunology* 8:421–434 (2008).

Delker R.K.; Fugmann S.; Papavasiliou F.N: A coming-of-age story: activation-induced cytidine deaminase turns 10. *Nature Immunology* 10:1147–1153 (2009).

Kato L.; Stanlie A.; Begum N.A.; Kobayashi M.; Aida M.; Honjo T: An evolutionary view of the mechanism for immune and genome diversityn. *Journal of Immunology* 188:3559–3566 (2012).

Liu M.; Schatz D.G: Balancing AID and DNA repair during somatic hypermutation. *Trends in Immunology* 30:173–181 (2009).

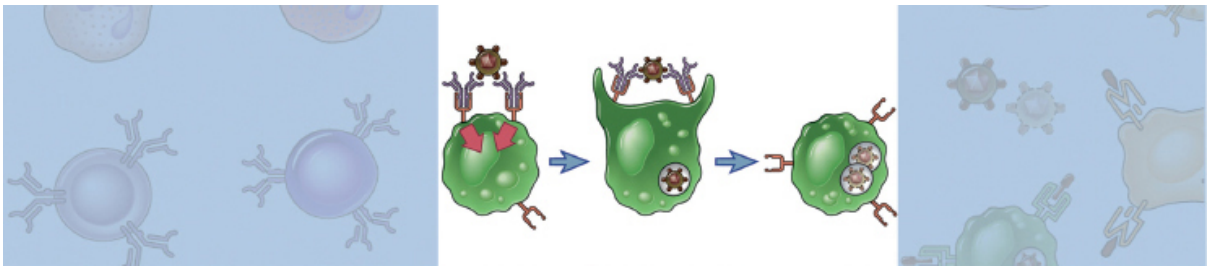
Neuberger M.S: Antibody diversification by somatic mutation: from Burnet onwards. *Immunology and Cell Biology* 86:124–132 (2008).

Peled J.U.; Kuang F.L.; Iglesias-Ussel M.D.; Roa S.; Kalis S.L.; Goodman M.F.; Scharff M.D: The biochemistry of somatic hypermutation. *Annual Review of Immunology* 26:481–511 (2008).

Stavnezer J.; Guikema J.E.; Schrader C.E: Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annual Review of Immunology* 26:261–292 (2008).

CAPITOLO

13



Meccanismi effettori dell’immunità umorale

CARATTERISTICHE GENERALI DELL’IMMUNITÀ UMORALE
NEUTRALIZZAZIONE DEI MICRORGANISMI E DELLE TOSSINE MICROBICHE
OPSONIZZAZIONE E FAGOCITOSI MEDIATA DA ANTICORPI
- Recettori per il frammento Fc espressi dai leucociti
- Citotossicità cellulare mediata da anticorpi
- Eliminazione degli elminti da parte degli anticorpi

SISTEMA DEL COMPLEMENTO
- Vie di attivazione del complemento
- Recettori per le proteine del complemento
- Regolazione dell’attivazione del complemento
- Funzioni del complemento
- Deficit del complemento
- Effetti patologici della normale funzione del complemento
- Elusione del complemento da parte dei microrganismi

IMMUNITÀ NEONATALE
RIEPILOGO

L’immunità umorale è mediata dagli anticorpi secreti e la sua funzione fisiologica è la difesa contro i microrganismi extracellulari e le tossine da essi prodotte. Questo tipo di immunità si differenzia da quella cellulare (l’altro braccio effettore della risposta immunitaria specifica), che è mediata dai linfociti T ed è deputata all’eliminazione di microrganismi che infettano le cellule dell’ospite e vivono al loro interno (vedi Capp. 10 e 11). L’immunità umorale è una forma di immunità che può essere trasferita a individui naïve mediante il trasferimento di siero prelevato da soggetti immunizzati. I tipi di microrganismi che possono essere combattuti dall’immunità umorale sono i batteri extracellulari, i miceti e persino alcuni microrganismi intracellulari come i virus, che possono essere intercettati dagli anticorpi prima che infettino le cellule dell’ospite o una volta rilasciati dalle cellule infettate. I deficit nella produzione di anticorpi si traducono in un aumento della suscettibilità alle infezioni da parte di svariati microrganismi, tra cui batteri, miceti e virus. I più efficaci vaccini attualmente in uso si basano sulla capacità di stimolare la produzione anticorpale (Tabella 13-1). Gli anticorpi, nonostante il loro ruolo protettivo, possono diventare pericolosi mediatori di danno tissutale negli

individui allergici e in alcune forme di autoimmunità. In questo capitolo discuteremo dei meccanismi effettori utilizzati dagli anticorpi per eliminare gli antigeni. La struttura degli anticorpi e il processo che porta alla loro produzione sono già stati descritti rispettivamente nel Capitolo 5 e nel Capitolo 12.

TABELLA 13-1 Attivazione dell'immunità umorale da parte dei vaccini

Malattia infettiva	Vaccino*	Meccanismi protettivi
Poliomielite	Virus della poliomielite attenuato somministrato per via orale	Neutralizzazione del virus da parte delle IgA delle mucose
Tetano, difterite	Tossoide	Neutralizzazione della tossina da parte delle IgG circolanti
Epatite A o B	Proteine ricombinanti dell'envelope virale	Neutralizzazione del virus da parte delle IgA mucosali o delle IgG circolanti
Polmonite pneumococcica, *Haemophilus*	Vaccini coniugati composti dai polisaccaridi della capsula batterica legati a una proteina carrier	Opsonizzazione e fagocitosi da parte delle IgM e IgG, direttamente o in seguito all'attivazione del complemento

*Sono elencati alcuni esempi di vaccini che agiscono stimolando la risposta umorale.

CARATTERISTICHE GENERALI DELL'IMMUNITÀ UMORALE

Prima di prendere in considerazione i principali meccanismi attraverso cui gli anticorpi proteggono contro i microrganismi, riassumeremo alcune delle caratteristiche più salienti dei meccanismi di difesa dell'ospite mediati dagli anticorpi.

- ***Le principali funzioni degli anticorpi sono rappresentate dalla neutralizzazione e dall'eliminazione dei microrganismi infettivi e delle tossine da essi prodotte*** (Fig. 13-1). Come verrà descritto in questo

capitolo, l’eliminazione degli antigeni mediata dagli anticorpi coinvolge svariati meccanismi effettori e richiede la partecipazione di vari componenti cellulari e umorali del sistema immunitario, inclusi i fagociti e le proteine del complemento. Prima di descrivere singolarmente questi meccanismi effettori, riassumeremo le modalità attraverso le quali gli anticorpi mediano l’immunità protettiva.

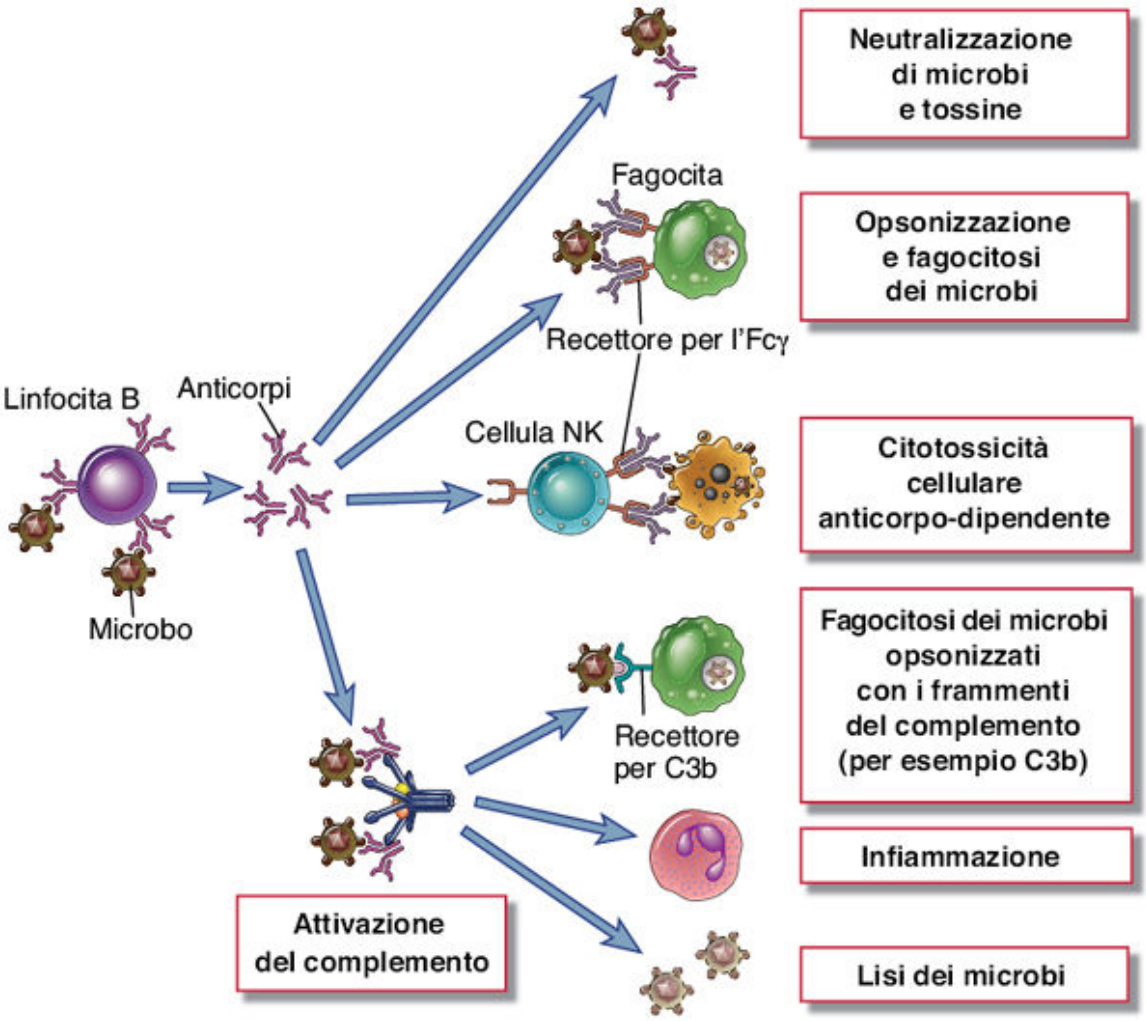


FIGURA 13-1 Funzioni effettrici degli anticorpi. Gli anticorpi diretti contro i microrganismi (e le tossine da essi prodotte, non mostrate in figura) possono neutralizzare gli agenti patogeni, opsonizzarli per favorire la loro fagocitosi o per attivare la citotossicità cellulare mediata dagli anticorpi, attivare il sistema del complemento. Tutte queste funzioni effettrici sono svolte da differenti classi anticorpali.

- ***Gli anticorpi sono prodotti dalle plasmacellule negli organi linfoidi secondari e nel midollo osseo, ma svolgono la loro funzione effettrice in luoghi distanti dai siti di produzione***. Gli anticorpi prodotti nei linfonodi,

nella milza e nel midollo osseo possono entrare nel sangue e circolare in tutti i distretti corporei. Gli anticorpi prodotti nei tessuti linfoidi associati alle mucose vengono trasportati attraverso la barriera epiteliale nel lume mucosale, come accade nell'intestino e nelle vie aeree, dove gli anticorpi secreti a livello della superficie luminale dell'epitelio inibiscono l'ingresso dei microrganismi ingeriti e inalati (vedi Cap. 14). Gli anticorpi sono anche attivamente trasportati nel circolo fetale attraverso la placenta. Talvolta, gli anticorpi possono essere prodotti nei tessuti periferici non linfoidi, in corrispondenza dei siti di infezione o di infiammazione cronica. Va osservato che anche i meccanismi effettori dell'immunità cellulo-mediata, cioè i linfociti T attivati, sono capaci di migrare ed esplicare la loro azione nei focolai d'infezione/infiammazione a livello periferico, ma non possono essere trasportati nelle secrezioni mucose o attraverso la placenta.

- ***Gli anticorpi responsabili della protezione immunitaria sono prodotti da plasmacellule a breve o a lunga sopravvivenza***. La prima esposizione a un antigene (causata da un'infezione o da una vaccinazione) porta all'attivazione dei linfociti B naïve e alla loro differenziazione in plasmacellule in grado di produrre anticorpi e cellule della memoria (vedi Cap. 12). Una successiva esposizione allo stesso antigene porta all'attivazione dei linfociti B della memoria e quindi a una più estesa e rapida risposta anticorpale. Le plasmacellule prodotte precocemente durante la risposta immunitaria così come i linfociti B della zona marginale e i linfociti i B1 nelle risposte immunitarie T-indipendenti tendono a essere caratterizzati da breve sopravvivenza. Al contrario, le plasmacellule che hanno subito lo scambio isotipico, che secernono anticorpi ad alta affinità e si sviluppano nei centri germinativi durante le risposte T-dipendenti agli antigeni proteici, tendono a migrare nel midollo osseo e qui sopravvivono per un lungo periodo, continuando a produrre anticorpi anche negli anni successivi all'eliminazione dell'antigene. La maggior parte delle immunoglobuline G (IgG) presenti nel siero dei soggetti sani deriva proprio dalle plasmacellule a lunga sopravvivenza che si sono originate dai linfociti B naïve o della memoria, attivati dall'esposizione agli antigeni incontrati nel corso della vita. Se un individuo precedentemente immunizzato incontra nuovamente lo stesso antigene, gli elevati livelli di anticorpi circolanti prodotti dalle plasmacellule a lunga sopravvivenza forniscono un'immediata protezione

contro l’infezione. Allo stesso tempo, l’antigene attiva anche i linfociti B della memoria, generando un ulteriore aumento dei livelli anticorpali, che assicurano una seconda e più efficace linea di difesa.

- ***Molte delle funzioni effettrici svolte dagli anticorpi sono a carico delle regioni costanti della catena pesante delle Ig. Ne deriva che isotipi diversi di Ig svolgono funzioni effettrici differenti*** (Tab. 13-2). Per esempio, alcune classi di IgG (IgG1 e IgG3) si legano ai recettori per il frammento cristallizzabile (Fc) dei fagociti, favorendo così la fagocitosi di particelle rivestite da anticorpi. Altre classi di IgG (IgG1, IgG2 e IgG3, ma non IgG4) e le IgM attivano il sistema del complemento. Le IgE si legano ai recettori per Fc (FcR) dei mastociti inducendone l’attivazione. Tutti questi meccanismi effettori verranno descritti più avanti in questo capitolo. La risposta immunitaria umorale è talmente diversificata e specializzata che l’esposizione a un determinato antigene stimola lo scambio verso l’isotipo anticorpale (e quindi verso il meccanismo effettore) più efficace per far fronte a quello specifico antigene. I principali stimoli che inducono lo scambio isotipico durante il processo di attivazione dei linfociti B sono rappresentati dalle citochine e dal ligando di CD40, entrambi espressi dai linfociti T helper follicolari attivati (vedi Cap. 12). La neutralizzazione è l’unica funzione effettrice degli anticorpi esclusivamente dovuta al legame con l’antigene. Essa infatti non richiede la partecipazione delle regioni costanti della catena pesante delle Ig.

TABELLA 13-2 Funzioni degli isotipi anticorpali

Isotipo anticorpale	Funzioni effettrici specifiche
IgG	Opsonizzazione dell’antigene per facilitare la fagocitosi da parte di macrofagi e neutrofili Attivazione della via classica del complemento Citotossicità cellulare anticorpo-dipendente da parte delle cellule NK Immunità neonatale: trasferimento degli anticorpi materni attraverso la placenta e l’intestino Feedback inibitorio dei linfociti B
IgM	Attivazione della via classica del complemento Recettore per l’antigene dei linfociti B naïve*
IgA	Immunità delle mucose: secrezione di IgA nel lume del tratto gastrointestinale e respiratorio

IgE	Degranulazione dei mastociti (reazioni di ipersensibilità immediata)
IgD	Recettore per l'antigene dei linfociti B naïve*
*Queste funzioni sono mediate da anticorpi di membrana e non da anticorpi solubili.	

- ***Sebbene le regioni costanti della catena pesante delle Ig siano responsabili della maggior parte delle funzioni effettrici, tutte queste funzioni sono avviate dal legame all'antigene attraverso le regioni variabili dell'Ig***. Il legame contemporaneo di diversi anticorpi a un antigene multivalente (come un polisaccaride o un epitopo ripetuto su una superficie antigenica) porta all'aggregazione delle regioni Fc. Questo processo porta all'attivazione del complemento e consente agli anticorpi di attivare gli FcR dei fagociti. Il fatto che il legame all'antigene sia necessario per l'aggregazione degli Fc (che a sua volta è necessaria per l'attivazione dei meccanismi effettori) garantisce che gli anticorpi attivino la risposta immunitaria solo se complessati con l'antigene e non quando sono liberi in circolo.

Riassunte le caratteristiche generali dell'immunità umorale, procederemo ora a descrivere più dettagliatamente le singole funzioni esplicate dagli anticorpi nella difesa dell'ospite.

NEUTRALIZZAZIONE DEI MICRORGANISMI E DELLE TOSSINE MICROBICHE

Legando i microrganismi e le tossine da essi prodotte, gli anticorpi ne bloccano il legame ai recettori cellulari (Fig. 13-2). In questo modo, gli anticorpi inibiscono o "neutralizzano" l'infettività dei microrganismi, nonché i potenziali effetti patogeni delle tossine microbiche. La penetrazione di molti microrganismi all'interno delle cellule dell'ospite avviene attraverso il legame di proteine della superficie del microrganismo stesso con proteine di membrana della cellula bersaglio. Per esempio, i virus dell'influenza usano le molecole di emoagglutinina espresse sul loro envelope per infettare le cellule epiteliali dell'albero respiratorio, mentre i batteri Gram-negativi usano proteine presenti sui loro pili per aderire e infettare le cellule dell'ospite. Gli

anticorpi diretti contro queste proteine interferiscono quindi con la capacità dei microrganismi di interagire con i loro recettori cellulari, rappresentando un classico esempio di inibizione per impedimento sterico. In altri casi, gli anticorpi si legano a un microrganismo alterando la conformazione della sua superficie, che non sarà più in grado di interagire con i recettori cellulari. Questo è un classico esempio di effetto allosterico esercitato dagli anticorpi. Anche molte tossine microbiche esercitano i loro effetti patologici legandosi a recettori cellulari specifici. Per esempio, la tossina tetanica si lega ai recettori presenti nelle placche motrici delle giunzioni neuromuscolari, inibendo la trasmissione dell'impulso nervoso e causando la paralisi. La tossina difterica si lega invece a recettori espressi da varie cellule che le permettono di penetrare e bloccare la sintesi proteica. Gli anticorpi diretti contro tali tossine ne ostacolano stericamente l'interazione con le cellule dell'ospite, prevenendo gli effetti patogeni e i conseguenti danni tissutali.

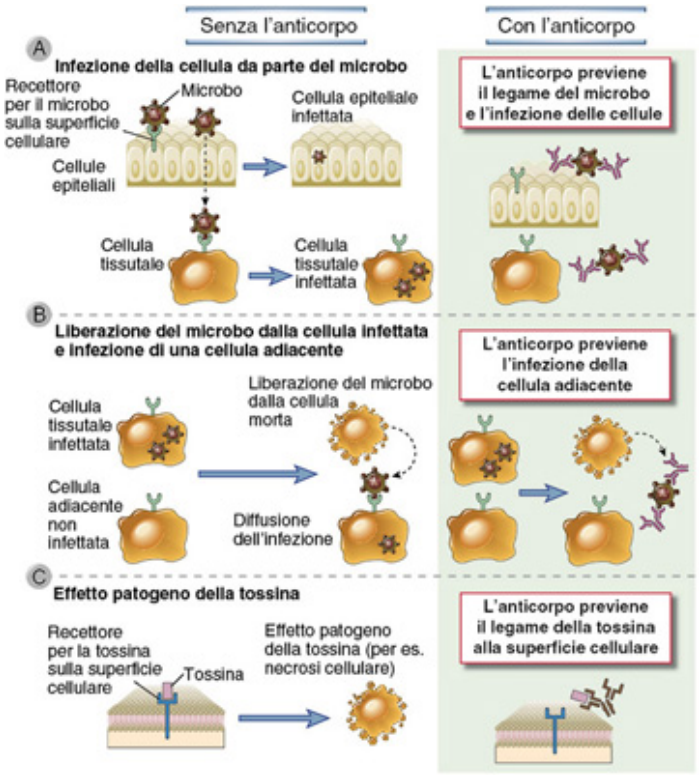


FIGURA 13-2 Neutralizzazione dei microrganismi e delle tossine da parte degli anticorpi. A. Gli anticorpi si legano ai microrganismi, prevenendone il legame alla cellula bersaglio e la conseguente infezione. **B.** Gli anticorpi inibiscono la diffusione dei microrganismi dalle cellule già infettate a quelle adiacenti. **C.** Gli anticorpi si legano alle tossine, prevenendone il legame alle cellule dell'ospite e inibendone gli effetti patologici.

All’anticorpo è sufficiente la sola regione di legame per l’antigene per legarsi (e quindi neutralizzare) un microrganismo o una tossina. Quindi, la neutralizzazione può essere esercitata da anticorpi di qualsiasi isotipo, circolanti o presenti nelle secrezioni mucose. L’effetto neutralizzante può inoltre essere ottenuto sperimentalmente anche con i frammenti Fab o $F(ab')_2$, che mancano delle regioni Fc delle catene pesanti. La maggior parte degli anticorpi neutralizzanti presenti nel siero e nelle secrezioni mucose appartiene rispettivamente alle classi IgG e IgA. Gli anticorpi neutralizzanti più efficaci sono quelli dotati di elevata affinità per l’antigene, come solitamente quelli prodotti dopo il processo di maturazione dell’affinità (vedi Cap. 12).

Molti vaccini profilattici agiscono proprio stimolando la produzione di anticorpi neutralizzanti a elevata affinità (vedi Tab. 13-1). Per sfuggire alle difese dell’ospite, i microrganismi hanno però sviluppato nel corso dell’evoluzione la capacità di variare i loro antigeni di superficie che rappresentano il bersaglio degli anticorpi neutralizzanti (vedi Cap. 16).

OPSONIZZAZIONE E FAGOCITOSI MEDIATA DA ANTICORPI

Gli anticorpi della classe IgG rivestono (opsonizzano) i microrganismi favorendone la fagocitosi attraverso il loro legame agli FcR dei fagociti. La cattura dei microrganismi da parte dei fagociti mononucleati e dei neutrofili è un presupposto necessario alla loro uccisione e degradazione intracellulare. I fagociti esprimono sulla loro superficie una serie di recettori che, legando direttamente i microrganismi, ne favoriscono la cattura anche in assenza di anticorpi. Questo rappresenta uno dei principali meccanismi effettori dell’immunità innata (vedi Cap. 4). L’efficienza di questo processo è notevolmente potenziata se al fagocita viene data la possibilità di legarsi al microrganismo con maggiore affinità. A questo riguardo, è quindi importante notare come i fagociti mononucleati e i neutrofili esprimano sulla loro superficie i recettori per la porzione Fc delle IgG che hanno rivestito (opsonizzato) i microrganismi. Inoltre, i microrganismi possono essere opsonizzati da un prodotto dell’attivazione del sistema del complemento denominato C3b. In questo caso, la fagocitosi viene mediata dal legame dei recettori specifici per il C3b, presenti sulla superficie del leucocita, con il C3b

che ha rivestito il microrganismo (vedi più avanti). Il processo di rivestimento degli antigeni da parte di molecole che favoriscono la fagocitosi è definito **opsonizzazione** e le molecole che svolgono questa funzione (tra cui gli anticorpi e alcuni frammenti del complemento) sono chiamate **opsonine**.

Recettori per il frammento Fc espressi dai leucociti

I recettori Fc sono espressi sulla superficie dei leucociti e legano le regioni costanti degli anticorpi che hanno opsonizzato un antigene. Questo legame determina l'attivazione della fagocitosi e della conseguente trasduzione del segnale, necessaria per innescare l'attività microbicida e il processo infiammatorio. Altri recettori Fc sono responsabili del trasporto degli anticorpi ai diversi siti.

I recettori per la porzione Fc delle diverse classi di Ig sono espressi da molti tipi di leucociti e svolgono numerose funzioni nell'ambito delle risposte immunitarie. Quelli coinvolti nel processo di fagocitosi degli antigeni opsonizzati sono i recettori per la catena pesante delle IgG, denominati recettori Fcγ (FcγR), sui quali ci soffermeremo in modo particolare in questo capitolo. I recettori Fc che legano le IgE saranno discussi nel Capitolo 20. Nel Capitolo 5 è stato preso in considerazione l'FcR neonatale (*Neonatal Fc Receptor*, FcRn), espresso dalla placenta, dall'endotelio vascolare e da altri tipi di cellule. Nel Capitolo 14 saranno trattate le Ig polivalenti, coinvolte nel processo di transcitosi delle IgA e delle IgM.

I recettori Fcγ sono stati classificati in tre gruppi, I, II e III, sulla base delle rispettive affinità per le catene pesanti delle diverse classi di IgG. Recettori Fc diversi presentano una diversa distribuzione cellulare (Tab. 13-3). In generale, i complessi immuni contenenti IgG1 e IgG3 risultano più efficienti nell'indurre l'attivazione dei recettori Fc rispetto a quelli che contengono la sottoclasse IgG2. Le IgG4 hanno un'affinità molto bassa e non sono in grado di attivare i recettori Fc, pertanto la funzione biologica di questo isotipo anticorpale è poco conosciuta. La maggior parte degli FcR svolge un ruolo di attivazione cellulare, con l'eccezione di FcγRIIB, che invece è un recettore inibitorio. Tutti gli FcRγ contengono una catena a responsabile del riconoscimento e del legame alle IgG. La diversa specificità e/o la diversa affinità mostrate dai vari FcγR per gli isotipi delle IgG dipendono proprio dalle differenze strutturali delle catene α. Tutti gli FcR risultano attivati in maniera ottimale solo dagli anticorpi complessati con l'antigene e non da quelli che

circolano liberi in soluzione. In tutti gli FcR, a eccezione di FcγRII, la catena α è associata a una o più catene polipeptidiche deputate alla trasduzione del segnale (Fig. 13-3). Diversamente, la trasduzione del segnale di FcγRII è dovuta alla coda citoplasmatica della catena α.

TABELLA 13-3 Recettori Fc

FcR	Affinità per l'anticorpo	Distribuzione cellulare	Funzione
FcγRI (CD64)	Elevata ($K_d \sim 10^{-9}$ M); lega IgG1 e IgG3, può legare IgG monomeriche	Macrofagi, neutrofili; anche eosinofi	Fagocitosi; attivazione dei fagociti
FcγRIIA (CD32)	Bassa ($K_d > 10^{-7}$ M)	Macrofagi, neutrofili; eosinofili, piastrine	Fagocitosi; attivazione cellulare
FcγRIIB (CD32)	Bassa ($K_d > 10^{-7}$ M)	Linfociti B, macrofagi, cellule dendritiche, altre cellule	Feedback inibitorio di diverse risposte cellulari
FcγRIIC (CD32)	Bassa ($K_d > 10^{-7}$ M)	Macrofagi, neutrofili, cellule NK	Fagocitosi, attivazione cellulare
FcγRIIIA (CD16)	Bassa ($K_d > 10^{-6}$ M)	Cellule NK	Citotossicità cellulare anticorpo-dipendente
FcγRIIIB (CD16)	Bassa ($K_d > 10^{-6}$ M); proteina GPI-legata	Neutrofili	Fagocitosi (poco efficiente)
FcεRI	Alta ($K_d > 10^{-10}$ M); lega IgE monomeriche	Mastociti, basofili, eosinofili	Attivazione cellulare (degranulazione)
FcεRII (CD23)	Bassa ($K_d > 10^{-7}$ M)	Linfociti B, eosinofili, cellule di Langerhans	Sconosciuta
FcαR (CD89)	Bassa ($K_d > 10^{-6}$ M)	Neutrofili, eosinofili, monociti	Attivazione cellulare?

GPI (*GlycoPhosphatidylinositol*), glicofosfatidilinositolo; NK, (*Natural Killer*).

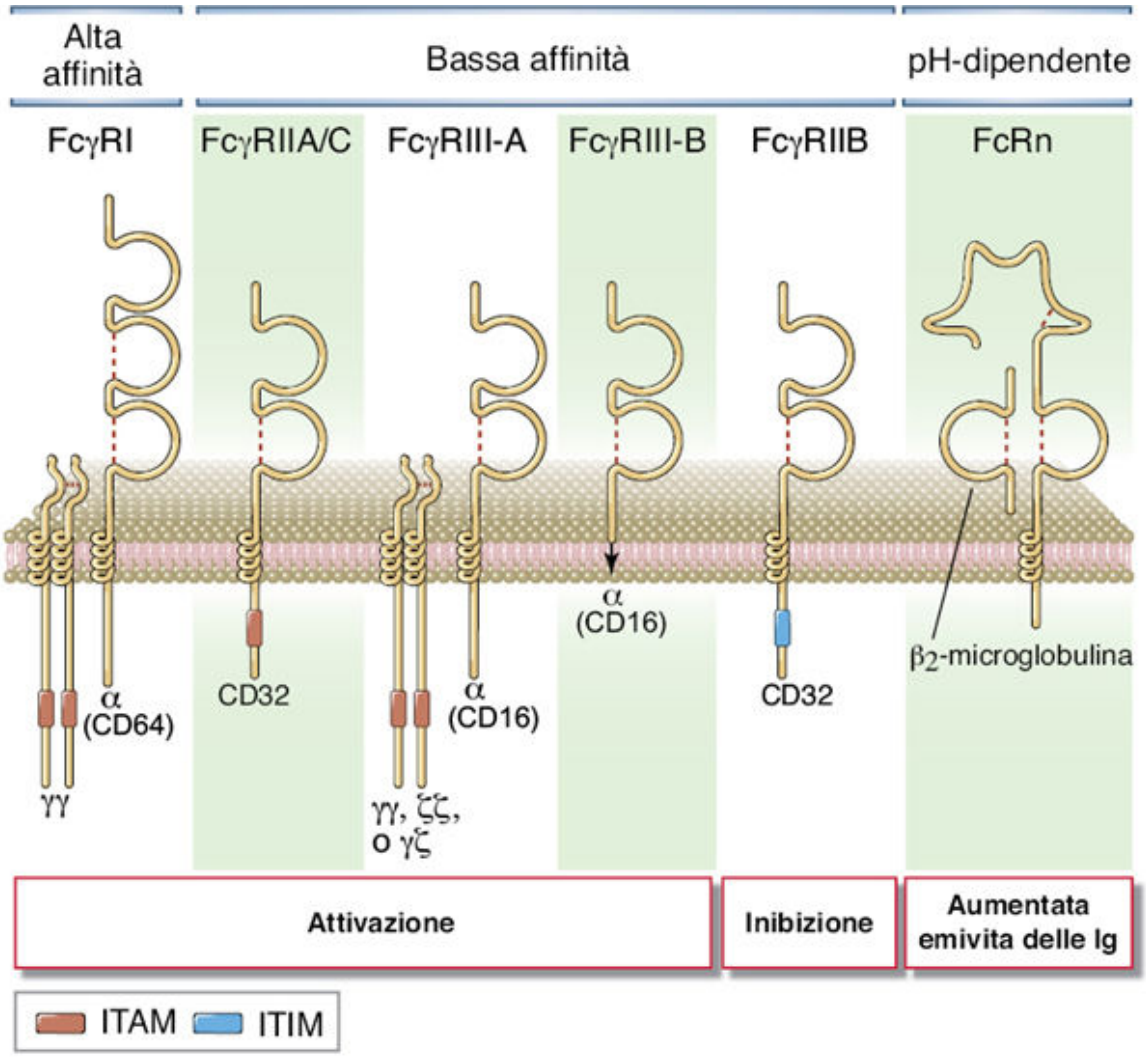


FIGURA 13-3 Struttura dei recettori Fcγ. Rappresentazione schematica dei recettori Fcγ umani che evidenzia le catene α, che legano il frammento Fc, e le catene responsabili della trasduzione del segnale. FcγRIIIB è una proteina di membrana con residui di glicosilfosfatidilinositolo, i cui meccanismi di trasduzione del segnale non sono ancora conosciuti. FcγRIIA e FcγRIIC sono recettori attivatori, a bassa affinità, strutturalmente simili, che possiedono però profili di espressione leggermente differenti. Notare che, sebbene FcγRIIA/C e FcγRIIB siano denominati tutti CD32, in realtà si tratta di proteine diverse con funzioni ben distinte (vedi il testo). FcR neonatale (FcRn) presenta una struttura simile a quella delle molecole MHC di classe I, ma non possiede una tasca per il legame del peptide.

I tre principali tipi di recettori Fcγ presentano molteplici isoforme che si contraddistinguono per struttura e funzione (vedi Tab. 13-3) e saranno descritti qui di seguito. L'FcR neonatale possiede una funzione peculiare ed è già stato discusso nel Capitolo 5.

- ***FcγRI*** (CD64) è il principale FcγR espresso dai fagociti. È infatti espresso dai macrofagi e dai neutrofili ed è dotato di elevata affinità per le

IgG1 e le IgG3 (K_d pari a 10^{-8}-10^{-9} M). (Nel topo, FcγRI si lega con elevata affinità preferenzialmente alle IgG2a e IgG2b/2c.) La lunga regione *N*-terminale extracellulare della sua catena α, responsabile del legame a Fc, si ripiega in tre domini sequenziali di tipo Ig. La catena α è associata a un omodimero costituito da due catene γ unite tra loro da ponti disolfuro e responsabili della trasduzione del segnale. La catena γ è presente anche nei complessi di trasduzione del segnale associati a FcγRIII, FcαR e FcεRI. Essa è caratterizzata da una corta sequenza *N*-terminale extracellulare e da una lunga sequenza C-terminale citoplasmatica con omologia strutturale alla catena ς del complesso del recettore per le cellule T (*T Cell Receptor*, TCR). Infatti, come quest'ultima, la catena γ degli FcR contiene domini ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*) responsabili dell'attivazione di tirosine chinasi a valle dell'attivazione degli FcR. FcγRI, in modo simile al recettore ad alta affinità per le IgE (vedi Cap. 20), è costantemente saturato dal legame con le Ig. L'attivazione degli FcR richiede che i recettori siano aggregati sulla superficie della membrana. In particolare, l'aggregazione e la conseguente attivazione di *FcγRI* risulta facilitata dalle IgG associate ad antigeni multivalenti. La trascrizione e l'espressione dell'*FCγRI* nei macrofagi è stimolata dall'interferone-γ (IFN-γ). Lo scambio di classe dei linfociti B verso le principali classi anticorpali che legano i recettori Fcγ (come per esempio nel topo le IgG2a) è anch'esso stimolato dall'IFNγ. Inoltre, l'IFN-γ stimola l'attività microbicida dei fagociti (vedi Cap. 11).

- ***FcγRII*** (CD32) nell'uomo lega le classi IgG1 e IgG3, con una bassa affinità (K_d pari a 10^{-6} M). Per effetto della duplicazione e della diversificazione genica, esistono tre diverse forme di FcγRII, chiamate A, B, e C. Queste isoforme, pur condividendo la specificità per il ligando e alcuni domini extracellulari, mostrano differenze nella struttura della coda citoplasmatica, nella distribuzione cellulare e nelle loro funzioni. FcγRIIA è espresso da neutrofili e fagociti mononucleati e contribuisce all'attività fagocitica di queste cellule, mentre FcγRIIC è espresso da fagociti mononucleati, neutrofili e cellule NK. Le code citoplasmatiche di FcγRIIA e di FcγRIIC contengono sequenze ITAM, che trasducono segnali di attivazione in seguito al legame da parte delle IgG1 o delle IgG3 che hanno opsonizzato i microrganismi o le cellule. FcγRIIB è un

recettore inibitorio espresso da cellule mieloidi e rappresenta l'unico FcR espresso dai linfociti B. Le sue funzioni saranno descritte più avanti.

- ***Fc*γ*RIII*** (CD16) è anch'esso un recettore a bassa affinità per le IgG. Il dominio di riconoscimento dell'anticorpo, presente nella porzione extracellulare, è simile a quello di FcγRII per struttura, affinità e specificità di legame. Questo recettore esiste in due isoforme, ciascuna codificata da un gene distinto. L'isoforma FcγRIIIA è una proteina transmembrana espressa soprattutto dalle cellule NK che si associa a omodimeri della catena γ o della catena ζ del TCR, oltre che a eterodimeri composti da una catena γ e una catena ζ. Questa associazione è necessaria per la sua espressione funzionale in membrana in quanto, attraverso le sue sequenze ITAM, trasduce segnali di attivazione all'interno della cellula. L'isoforma FcγRIIIB è una proteina associata alla membrana plasmatica dei neutrofili attraverso un residuo di glicosilfosfatidilinositolo (GPI); in queste cellule non sembra essere coinvolto nel processo di fagocitosi o di attivazione cellulare e le sue funzioni sono ancora poco conosciute.

Oltre ai recettori Fcγ, esistono recettori specifici per le catene pesanti delle IgE e delle IgA (vedi Tab. 13-3). FcεRI sarà descritto nel Capitolo 20, durante la trattazione dell'attivazione dei mastociti. La funzione di FcαR non è ancora stata ben identificata.

Ruolo dei recettori Fcγ nella fagocitosi e nell'attivazione dei fagociti

La fagocitosi degli antigeni opsonizzati dalle IgG è mediata dall'interazione della porzione Fc con gli FcγR espressi dai fagociti (Fig. 13-4). Ne deriva che gli isotipi IgG1 e IgG3, che si legano con maggiore affinità a questi recettori, sono le opsonine più efficaci nel favorire la fagocitosi. Come detto precedentemente, FcγRI (CD64) è un recettore ad alta affinità espresso dai fagociti e rappresenta il più importante per la fagocitosi degli antigeni opsonizzati.

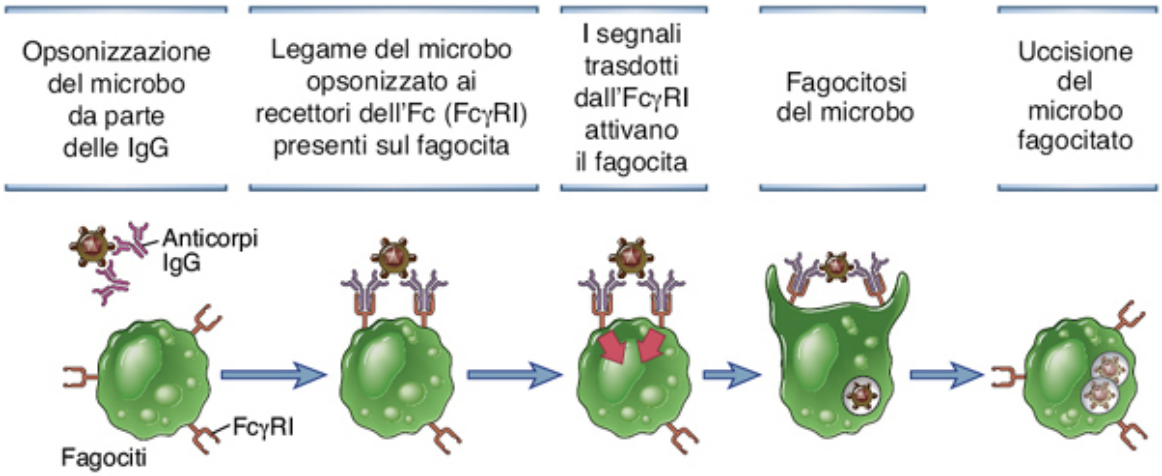


FIGURA 13-4 Opsonizzazione e fagocitosi dei microrganismi mediate dagli anticorpi. Dopo aver legato il microrganismo, alcune classi di IgG vengono riconosciute dagli FcR espressi sulla superficie dei fagociti. Ciò attiva la trasduzione di segnali che potenziano la fagocitosi e l'uccisione intracellulare del microrganismo opsonizzato. Il meccanismo microbicida dei fagociti è descritto nei Capitoli 4 (vedi Fig. 4-13) e 10 (vedi Fig. 10-7).

Il legame degli antigeni opsonizzati al recettore per Fc avvia la loro internalizzazione in vescicole fagocitiche, i fagosomi, che si fondono successivamente con i lisosomi per formare i fagolisososmi, all'interno dei quali avviene la degradazione dell'antigene fagocitato.

L'attivazione richiede il cross-linking degli FcR da parte di molecole Ig adiacenti (per esempio quelle legate alla superficie di un microrganismo o aggregate in immunocomplessi). Il cross-linking delle catene α di un FcR legate ad antigeni multivalenti attiva la trasduzione di segnali simili a quelli trasdotti dopo il cross-linking dei recettori per l'antigene dei linfociti (vedi Cap. 7). Tali segnali comprendono: 1) la fosforilazione dei residui di tirosina delle sequenze ITAM delle catene degli FcR a opera delle chinasi Src; 2) il reclutamento SH2-dipendente delle chinasi della famiglia Syk alle sequenze ITAM fosforilate; 3) l'attivazione della chinasi fosfatidilinositolo 3 (PI3-kinase); 4) il reclutamento di molecole adattatrici, come SLP-76 e BLNK; 5) il reclutamento di enzimi quali la fosfolipasi Cγ e i membri della famiglia delle chinasi Tec. Tutti questi eventi portano alla generazione di inositolo trifosfato e di diacilglicerolo e a un'intensa mobilizzazione di ioni calcio.

L'attivazione di queste vie di trasduzione del segnale determina una serie di risposte nei leucociti, che comprendono la trascrizione di geni che codificano per le citochine, mediatori dell'infiammazione, enzimi ad attività microbicida e riorganizzazione del citoscheletro (che porta a fagocitosi, degranulazione e

migrazione cellulare). Le più importanti sostanze battericide prodotte nei fagociti attivati sono rappresentate dalle specie reattive dell'ossigeno, dall'ossido nitrico e da enzimi idrolitici, già trattati nel Capitolo 4. Il danno tissutale causato dagli anticorpi è importante nella patogenesi delle malattie da ipersensibilità (vedi Cap. 19). Il fatto che topi knockout per i geni che codificano per la catena α di FcγRI o per la catena di trasduzione γ mostrino deficit delle difese umorali e non sviluppino alcuna forma di danno tissutale dovuto alle IgG dimostra l'importanza degli FcR in questi processi.

Inibizione da parte del recettore FcγRIIB

FcγRIIB è un recettore inibitorio, originariamente descritto nel contesto dei meccanismi che inibiscono i linfociti B attraverso un meccanismo di feedback anticorpale (vedi Cap. 12). FcγRIIB è espresso anche dalle cellule dendritiche, dai neutrofili, dai macrofagi e dai mastociti e potrebbe controbilanciare l'attivazione di queste cellule da parte di altri FcR e altri stimoli. Una terapia apparentemente empirica, ma frequentemente utilizzata per la cura di diverse forme di autoimmunità, è rappresentata dall'inoculo endovenoso di IgG umane (*IntraVenous ImmunoGlobulin*, IVIG). Tale trattamento potrebbe sia aumentare l'espressione e l'ingaggio di FcγRIIB, sia inviare segnali inibitori che riducono la produzione di anticorpi e contribuiscono a smorzare il processo infiammatorio. Un ulteriore meccanismo attraverso cui l'IVIG potrebbe apportare beneficio a questi pazienti è la possibile competizione con gli autoanticorpi circolanti per l'FcRn, con il conseguente aumento dell'eliminazione degli autoanticorpi (vedi Cap. 5).

Citotossicità cellulare mediata da anticorpi

Tramite i loro FcR, le cellule NK e altri leucociti sono in grado di legarsi e uccidere le cellule opsonizzate dagli anticorpi. Questo processo viene definito citotossicità mediata da anticorpi (*Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*, ADCC) (Fig. 13-5) e venne descritto per la prima volta come un'azione svolta dalle cellule NK che, attraverso il loro FcR, FcγRIIIA, riconoscono e legano le cellule opsonizzate dagli anticorpi. L'FcγRIIIA (CD16) è un recettore a bassa affinità che lega le IgG solo quando si presentano aggregate sulla superficie cellulare, ma non quando sono presenti in forma monomerica circolante. Quindi, il fenomeno dell'ADCC si verifica solo quando una cellula bersaglio è opsonizzata dalle IgG, mentre gli anticorpi

monomerici circolanti non competono efficacemente per il legame a FcγRIII né possono attivare direttamente le cellule NK. Il legame e l'attivazione di FcγRIII da parte delle IgG aggregate stimolano le cellule NK a sintetizzare le citochine, come l'IFN-γ, e a liberare il contenuto dei loro granuli svolgendo così la loro funzione citolitica (vedi Cap. 4). Il fenomeno dell'ADCC può essere facilmente riprodotto *in vitro*, ma il suo reale contributo alla difesa contro i microrganismi *in vivo* non è ancora stato definito. L'ADCC potrebbe rappresentare un importante meccanismo per l'eliminazione di cellule opsononizzate da specifici anticorpi monoclonali utilizzati a scopo terapeutico, come i linfociti B normali o trasformati in senso neoplastico, che rappresentano il bersaglio di anticorpi monoclonali anti-CD20.

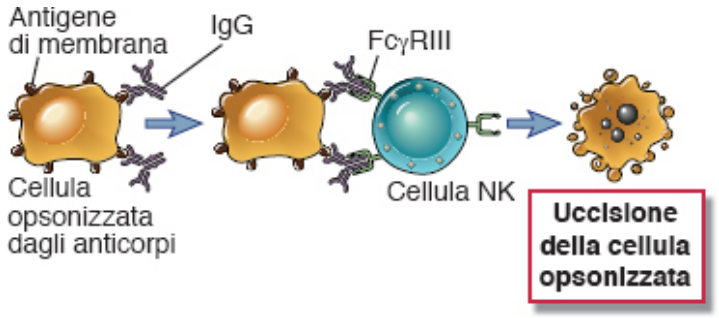


FIGURA 13-5 Citotossicità cellulare mediata da anticorpi. Dopo essersi legati alla cellula infettata, alcuni isotipi IgG vengono riconosciuti attraverso le regioni Fc da FcγR espressi dalle cellule NK che vengono così attivate a uccidere la cellula opsonizzata.

Eliminazione degli elminti da parte degli anticorpi

Gli anticorpi, i mastociti e gli eosinofili collaborano per determinare l'espulsione e l'uccisione di alcuni parassiti elmintici. Gli elminti (particolari tipi di vermi) sono troppo grandi per essere ingeriti dai fagociti e i loro tegumenti sono resistenti alle molecole microbicide prodotte dai neutrofili e dai macrofagi. Essi possono però essere uccisi da una proteina cationica tossica, definita proteina basica maggiore, che è contenuta nei granuli degli eosinofili. Le IgE e, in minor misura, le IgG e le IgA che rivestono l'elminta possono legare gli FcR presenti sugli eosinofili e attivare il processo di degranulazione e il conseguente rilascio della proteina basica maggiore e di altre molecole che sono in grado di uccidere il parassita. Il recettore Fcε ad alta affinità espresso dagli eosinofili (FcεRI) manca della catena β ed è in grado di trasdurre segnali solo quando è associato alla catena γ. Inoltre, le IgE che hanno riconosciuto i determinanti antigenici della superficie dell'elminta

possono legare il recettore ad alta affinità per le IgE espresso dai mastociti, innescandone la degranulazione a livello locale (vedi Cap. 20). I mediatori rilasciati durante tale processo possono contribuire alla broncocostrizione e alla motilità locale delle vie aeree superiori o del tratto gastrointestinale, favorendo l'espulsione dei parassiti. Le chemochine e le citochine rilasciate dai mastociti possono reclutare gli eosinofili causandone al contempo la degranulazione.

SISTEMA DEL COMPLEMENTO

Il sistema del complemento è uno dei principali meccanismi effettori dell'immunità umorale, oltre a essere un importante meccanismo effettore dell'immunità innata (vedi Cap. 4). Verranno qui descritti in dettaglio i processi di attivazione e regolazione di tale sistema.

Il nome "complemento" deriva dagli esperimenti eseguiti da Jules Bordet poco dopo la scoperta degli anticorpi. Egli dimostrò che se si incubano a temperatura fisiologica (37 °C) dei batteri con siero contenente anticorpi specifici, i batteri vengono lisati. Se, tuttavia, il siero viene riscaldato a temperature superiori ai 56 °C prima di essere aggiunto ai batteri, esso perde la propria capacità litica. Tale perdita non è dovuta alla denaturazione degli anticorpi, poiché essi sono termostabili e mantengono la capacità di agglutinare i batteri dopo il riscaldamento. Bordet concluse quindi che nel siero doveva essere presente un'altra componente, termolabile, che aiutava ("complementava") la lisi dei batteri mediata dagli anticorpi. Questa componente venne in seguito definita con il nome appunto di **complemento**.

Il sistema del complemento è costituito da numerose proteine solubili e di membrana, che interagiscono tra loro e con altre componenti del sistema immunitario in modo strettamente controllato, generando una serie di proteine funzionali all'eliminazione dei microrganismi. Le proteine del complemento sono proteine normalmente presenti nel torrente circolatorio sotto forma di precursori inattivi che vengono attivati solo in particolari condizioni, originando prodotti bioattivi responsabili delle diverse funzioni effettrici. Il processo di attivazione del complemento ha numerose caratteristiche, essenziali per il suo corretto funzionamento.

- ***Il sistema del complemento è attivato da microrganismi e da anticorpi legati a essi o ad altri antigeni***. I meccanismi che ne innescano l'attivazione saranno discussi più avanti.
- ***L'attivazione del complemento avviene attraverso la proteolisi sequenziale delle sue diverse componenti, che porta all'assemblaggio di complessi enzimatici dotati essi stessi di attività proteolitica***. Le proteine che acquisiscono attività proteolitica per azione di altre proteine sono chiamate *zimogeni*. Il processo di attivazione sequenziale degli zimogeni, caratteristico anche del sistema della coagulazione e delle chinine, avviene con un meccanismo a cascata proteolitica che consente una straordinaria amplificazione del processo, poiché ogni singola molecola dell'enzima attivato in ciascuna delle tappe può attivare molteplici molecole dell'enzima nella tappa successiva.
- ***I prodotti di attivazione del complemento si legano covalentemente agli antigeni sulla superficie di un microrganismo, nonché agli anticorpi che hanno riconosciuto lo stesso microrganismo e ai corpi apoptotici***. Nella fase fluida, le proteine del complemento sono presenti in forma inattiva o attivate transitoriamente per frazioni di secondo. Esse si attivano stabilmente solo dopo essersi legate ai microrganismi, agli anticorpi o alle cellule in apoptosi. Molti dei loro prodotti sono biologicamente attivi, si legano covalentemente ai microrganismi, agli anticorpi o ai tessuti nei quali si è verificata l'attivazione del complemento. Questa caratteristica garantisce che la completa attivazione del sistema del complemento (e quindi il pieno dispiegarsi dei suoi effetti biologici) sia limitata alla superficie del microrganismo o alla sede in cui gli anticorpi si sono legati agli antigeni evitando al contempo che tale fenomeno si estenda ad altri distretti o nel circolo.
- ***L'attivazione del complemento è inibita da proteine espresse sulla membrana delle cellule dell'ospite, ma non sulla superficie dei microrganismi***. Tali proteine hanno l'importante compito di prevenire o almeno ridurre al minimo gli effetti lesivi derivati dall'eventuale attivazione del complemento sulle cellule dell'ospite. Essendo i microrganismi privi di queste proteine inibitorie, l'azione lesiva del complemento si esplicherà appieno sulla loro membrana. I corpi apoptotici sono privi di queste proteine inibitorie ma sono in grado di reclutare proteine inibitorie dal circolo sanguigno, riducendo in questo

modo l’attivazione del complemento e del conseguente processo infiammatorio.

Vie di attivazione del complemento

Vi sono tre maggiori vie di attivazione del complemento: la via classica, attivata da alcune classi di anticorpi a seguito della loro aggregazione causata da antigeni multivalenti; la via alternativa, attivata direttamente da alcuni componenti della superficie microbica in assenza di anticorpi; la via lectinica, attivata appunto da una lectina del plasma in seguito al suo legame ai residui di mannosio presenti sulla superficie microbica (Fig. 13-6). Gli aggettivi *classica* e *alternativa* derivano dal fatto che la via classica fu scoperta e caratterizzata per prima, benché sia filogeneticamente più recente di quella alternativa. Le vie di attivazione del complemento, sebbene differiscano per le modalità attraverso cui vengono avviate, portano tutte alla generazione di complessi enzimatici in grado di clivare la frazione C3, che rappresenta la componente più abbondante del complemento. La via alternativa e quella lectinica devono essere considerate risposte immunitarie innate, mentre la via classica rappresenta un meccanismo effettore dell’immunità specifica umorale.

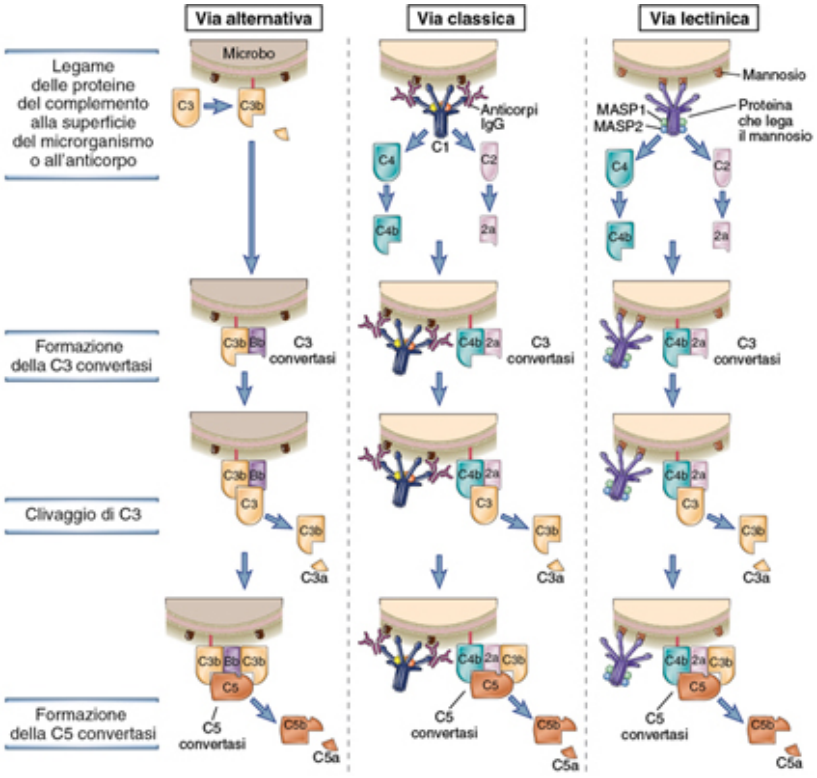


FIGURA 13-6 Rappresentazione schematica delle fasi precoci di attivazione delle vie alternativa, classica e lectinica del complemento. La via alternativa viene innescata dal legame del frammento C3b a varie superfici (per esempio la parete di un microrganismo). La via classica viene invece attivata dal legame del frammento C1 agli immunocomplessi e la via lectinica viene attivata dal legame delle lectine plasmatiche ai microrganismi. Il frammento C3b, generato per azione della C3 convertasi, si lega covalentemente alla superficie del microrganismo o agli anticorpi, partecipando alla formazione del complesso enzimatico che taglia il frammento C5 (C5 convertasi) e innescando così le tappe tardive dell'attivazione del complemento (non mostrate in figura) che sono comuni a tutte e tre le vie di attivazione. Le funzioni effettrici del complemento sono quindi identiche, indipendentemente dalla via di attivazione.

L'evento centrale dell'attivazione del complemento è la proteolisi della frazione C3 con la generazione di prodotti biologicamente attivi, tra i quali il C3b, che si lega covalentemente alla superficie del microrganismo o agli anticorpi a esso associati (vedi Fig. 13-6). Il processo di attivazione del complemento dipende dalla formazione di due complessi proteolitici: la **C3 convertasi** (che scinde la frazione C3 in due frammenti proteolitici definiti C3a e C3b) e la **C5 convertasi** (che scinde la frazione C5 in C5a e C5b). Per convenzione, i prodotti proteolitici di ciascun componente del complemento vengono identificati con un suffisso minuscolo, dove le lettere "a" e "b" si riferiscono ai frammenti di dimensioni minore e maggiore, rispettivamente. Al sito di attivazione del complemento, il frammento C3b si lega covalentemente alla superficie del microrganismo (o agli anticorpi a esso associati). Tutte le funzioni biologiche svolte dal complemento dipendono dal taglio proteolitico della frazione C3. Per esempio, l'attivazione del complemento promuove la fagocitosi perché C3b si lega covalentemente ai microbi, e i fagociti (neutrofili e macrofagi) esprimono recettori per il frammento C3b. Inoltre, i prodotti proteolitici della C3 (così come quelli di altre proteine del complemento) stimolano l'infiammazione. La C5 convertasi, che si assembla solo dopo la generazione del frammento C3b, contribuisce sia al processo infiammatorio (attraverso il suo frammento C5a) sia alla formazione di pori nella membrana dei microrganismi bersaglio. Le vie di attivazione del complemento differiscono principalmente per il modo in cui viene prodotto il frammento C3b, ma dopo la scissione della frazione C5 si esplicano secondo una serie di tappe comuni.

Fatte queste premesse, procederemo ora a una più dettagliata descrizione delle vie alternativa, classica e lectinica di attivazione del complemento.

Attivazione della via alternativa

La via alternativa di attivazione del complemento porta alla proteolisi della frazione C3 e alla conseguente formazione del frammento C3b che si lega covalentemente alla superficie microbica in assenza di anticorpi (Fig. 13-7 e Tab. 13-4). Normalmente, la frazione C3 presente nel plasma è sottoposta a un lento, ma continuo, processo di clivaggio che porta alla generazione del frammento C3b; tale processo viene definito *tickover*. La C3 contiene un gruppo tioesterico estremamente reattivo, ma circondato (e quindi reso inaccessibile) da un più largo dominio, anch'esso definito *dominio tioesterico*. Quando viene tagliato, il frammento C3b subisce imponenti modificazioni conformazionali a livello del dominio tioesterico (un significativo spostamento di 85 Å), che espongono (rendendolo accessibile) il gruppo tioesterico reattivo. Una piccola quantità di C3b può quindi legarsi covalentemente alla superficie di tutti i tipi cellulari, compresi i microrganismi eventualmente presenti in circolo. A livello molecolare, tale legame avviene attraverso il gruppo tioesterico del frammento C3b che reagisce con i gruppi aminici o idrossilici presenti nelle proteine o nei polisaccaridi delle superfici cellulari, formando così legami covalenti aminici o esterici (Fig. 13-8). Se questi legami non si formano, il frammento C3b rimane in fase fluida e il suo gruppo tioesterico reattivo esposto viene rapidamente idrolizzato. Di conseguenza, il C3b si inattiva e l'attivazione del complemento non può procedere.

TABELLA 13-4 Proteine della via alternativa del complemento

Proteina	Struttura	Concentrazione nel siero (µg/ml)	Funzione
C3	185kD (subunità α, 110 kD; subunità β, 75kD)	1.000-1.200	C3b si lega alla superficie del microbo funzionando come opsonina e come componente della C3 e della C5 convertasi C3a stimola l'infiammazione (anafilotossina)
Fattore B	Monomero di 93 kD	200	Bb è una serina-proteasi e rappresenta la componente

			enzimatica di C3 e C5 convertasi
Fattore D	Monomero di 25 kD	1-2	Serina-proteasi plasmatica, taglia il fattore B associato a C3b
Properdina	Composta da 1-4 subunità di 56 kD	25	La properdina stabilizza laC3 convertasi (C3bBb) sulla superficie dei microbi

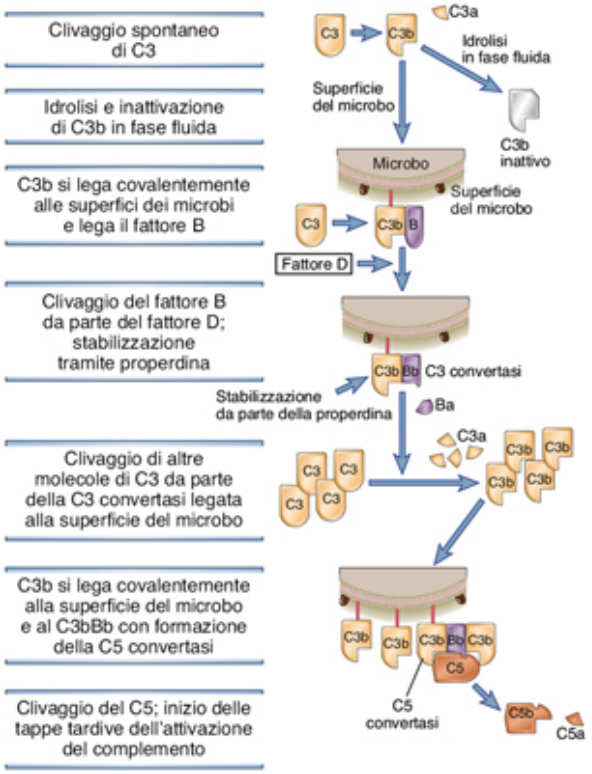


FIGURA 13-7 Attivazione della via alternativa del complemento. L'idrolisi spontanea della componente C3 presente nel plasma porta alla formazione della C3 convertasi in fase fluida (non mostrata in figura) e quindi alla formazione del frammento C3b. Se il C3b si associa alla superficie di un microrganismo, tende a legarsi al fattore B, costituendo così la C3 convertasi della via alternativa. Questa taglia la frazione C3 amplificando enormemente la produzione di C3b che, legandosi alla superficie del microrganismo, partecipa alla formazione della C5 convertasi. Quest'ultima taglia il frammento C5 generando il C5b, il primo componente della sequenza terminale di attivazione del complemento.

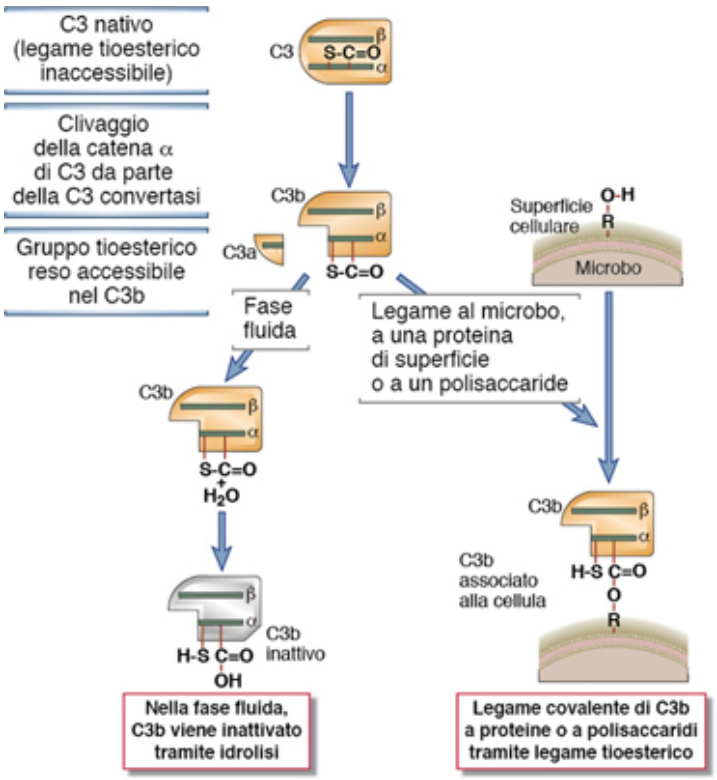


FIGURA 13-8 Gruppo tioesterico interno della frazione C3. Una volta clivata, la catena α della C3 assume una forma metastabile in cui il gruppo tioesterico interno diventa esposto e suscettibile all'attacco di radicali ossidrili (qui riportati come esempio) o aminici. Ciò causa la formazione di legami covalenti con proteine o carboidrati presenti sulla superficie cellulare. La frazione C4 è dotata di un certo grado di omologia strutturale con la C3 e in particolare possiede un identico gruppo tioesterico.

In alternativa, il processo di imponente modificazione conformazionale del frammento C3b può causare l'esposizione, oltre che del gruppo tioesterico, anche di un sito di legame per un'altra proteina plasmatica denominata fattore B. Il fattore B si lega alla proteina C3b che si trova a sua volta legata covalentemente alla superficie di un microrganismo o della cellula ospite. Appena legatosi alla proteina C3b, il fattore B viene clivato a opera di una serina proteasi plasmatica chiamata fattore D, rilasciando un piccolo frammento definito Ba e originando al contempo un frammento Bb più grande che rimane legato al frammento C3b. Il complesso C3bBb rappresenta la C3 convertasi della via alternativa e la sua funzione è clivare massicciamente la frazione C3, innescando un circuito di amplificazione che genera quantità sempre maggiori di C3b. Anche quando è prodotto attraverso la via classica o quella lectinica, il frammento C3b può associarsi al frammento Bb e agire enzimaticamente sulla frazione C3 come appena descritto. Si può quindi affermare che la C3 convertasi della via alternativa amplifica l'attivazione del

complemento indipendentemente dal fatto che questa venga avviata dalla via classica, da quella alternativa o da quella lectinica. Non bisogna infine dimenticare che, mentre la frazione C3 viene clivata, il frammento C3b si associa a una superficie cellulare e il frammento C3a si libera in circolo. Questo frammento solubile svolge numerose funzioni biologiche, che verranno discusse più avanti in questo capitolo.

L'attivazione stabile della via alternativa si può verificare solo a livello di una superficie microbica e non a livello delle membrane delle cellule dell'ospite. Se il complesso C3bBb (C3 convertasi della via alternativa) si forma su una cellula dell'ospite, esso viene rapidamente degradato (e l'attivazione del complemento viene quindi bloccata) per l'azione di diverse proteine regolatorie specificamente espresse su queste cellule (vedi più avanti). L'assenza di queste proteine regolatorie sulla superficie dei microrganismi consente invece l'ulteriore attivazione della C3 convertasi della via alternativa e quindi la progressione del processo di attivazione del complemento. Un'altra proteina della via alternativa, la properdina, può legarsi al complesso C3bBb stabilizzandolo. Ancora una volta, l'azione della properdina avviene preferenzialmente sulla superficie dei microrganismi e non sulla membrana delle cellule dell'ospite. La properdina è l'unico regolatore positivo del complemento finora identificato.

Il frammento C3b generato dalla C3 convertasi della via alternativa può legarsi alla C3 convertasi stessa. Ciò porta alla formazione di un complesso contenente il frammento Bb e due molecole del frammento C3b che agisce da C5 convertasi della via alternativa clivando la frazione C5 e innescando le fasi terminali dell'attivazione del complemento.

Attivazione della via classica

La via classica è avviata dal legame della frazione C1 ai domini C_H2 delle IgG o ai domini C_H3 delle IgM complessate all'antigene (Fig. 13-9 e Tab. 13-5). Nell'uomo, gli isotipi anticorpali più efficienti nell'attivare il complemento sono le IgG3 e le IgG1. La frazione C1 è un complesso proteico multimerico di grandi dimensioni composto dalle subunità C1q, C1r e C1s. La subunità C1q è deputata al legame con l'anticorpo, mentre la C1r e la C1s sono dotate di attività proteasica. La C1q ha una struttura simile a un ombrello, è composta da 6 catene disposte radialmente, ognuna con una testa globulare e tutte connesse a uno stelo centrale strutturalmente simile al collageno (Fig. 13-10).

Per adempiere alla funzione di legame all'anticorpo, l'esamero C1q deve legare specificamente le regioni Fc delle catene μ e di alcune catene pesanti γ. Solo più anticorpi legati a un antigene multivalente e non i singoli anticorpi liberi circolanti possono innescare l'attivazione della via classica del complemento (Fig. 13-11). Ciò accade perchè ogni regione Fc possiede un solo sito di legame per la C1q, mentre quest'ultima richiede l'interazione con almeno due porzioni Fc per essere attivata. Perché abbia inizio l'attivazione della via classica del complemento è necessario che due o più porzioni Fc siano accessibili alla frazione C1. In effetti, proprio perché ogni IgG possiede una sola porzione Fc, ognuna di esse deve aggregarsi legandosi alla superficie di un antigene multivalente affinché la C1q possa riconoscerla e legarsi a essa. Le IgM libere e quelle circolanti nel plasma, sebbene siano pentameriche, non legano la C1q, poiché in questa configurazione le 5 regioni Fc delle IgM sono inaccessibili alla C1q. Viceversa, legandosi a un antigene, le IgM subiscono una modificazione conformazionale che espone le porzioni Fc alla C1q permettendone il legame. Va osservato che, grazie alla sua struttura pentamerica, una singola molecola di IgM può legare due molecole C1q; ne deriva che le IgM sono più efficienti delle IgG nel legare e attivare (fissare) il complemento.

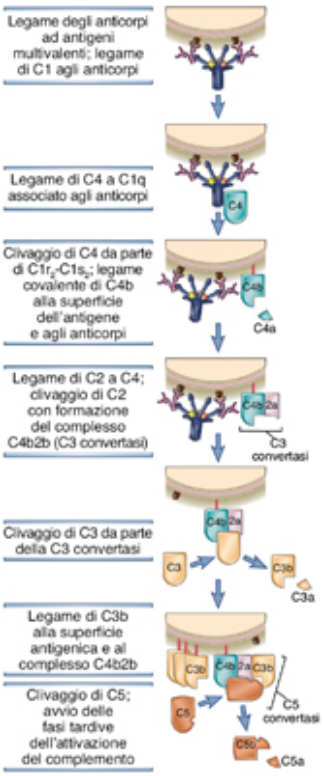


FIGURA 13-9 Attivazione della via classica del complemento. Gli immunocomplessi che attivano la via classica possono essere solubili, associati alla superficie delle cellule (come mostrato in figura) o a matrici extracellulari. La via classica viene innescata dal legame della frazione C1 agli anticorpi che hanno legato l'antigene, con conseguente produzione della C3 convertasi e della C5 convertasi, che rimangono associate alla superficie in corrispondenza degli stessi anticorpi che hanno causato la loro produzione. La C5 convertasi taglia la frazione C5 dando inizio alla sequenza terminale di attivazione del complemento.

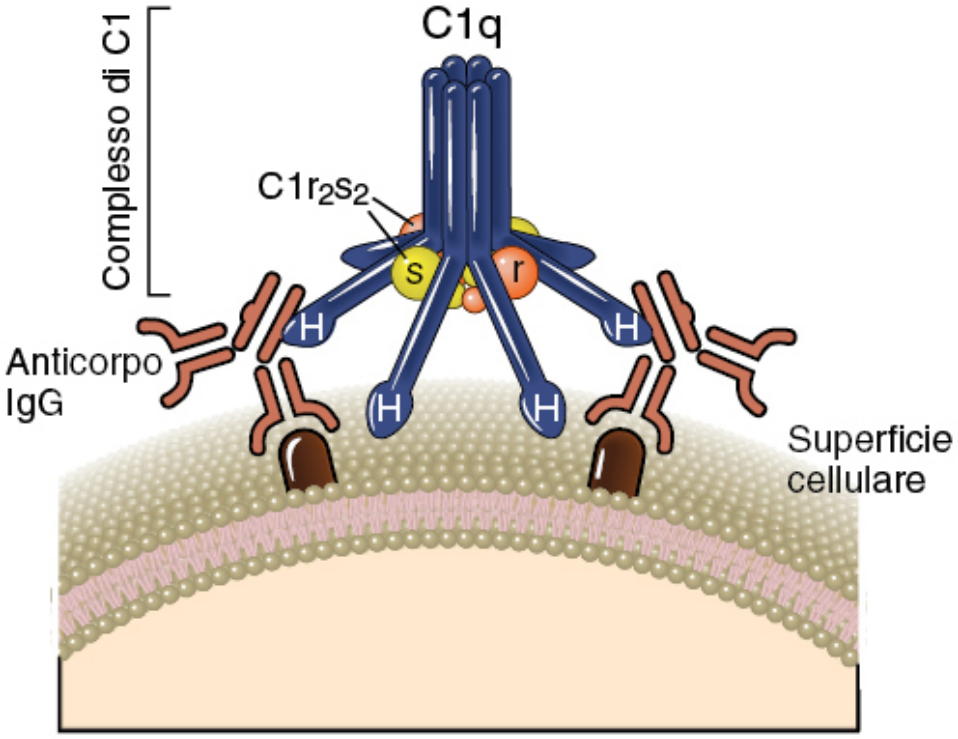


FIGURA 13-10 Struttura della frazione C1. La subunità C1q è composta da 6 subunità identiche che si dispongono a formare un nucleo centrale che termina in 6 bracci mobili disposti radialmente. Le teste globulari dell'estremità di ogni braccio (indicate con la lettera H) rappresentano i domini attraverso i quali la C1q lega le Ig. Due molecole di C1r e altrettante di C1s si associano a formare un tetramero $C1r_2$-$C1s_2$ che si avvolge attorno ai bracci radiali della C1q in modo da giustapporre i domini catalitici di C1r e C1s (indicati con le lettere r e s, rispettivamente).

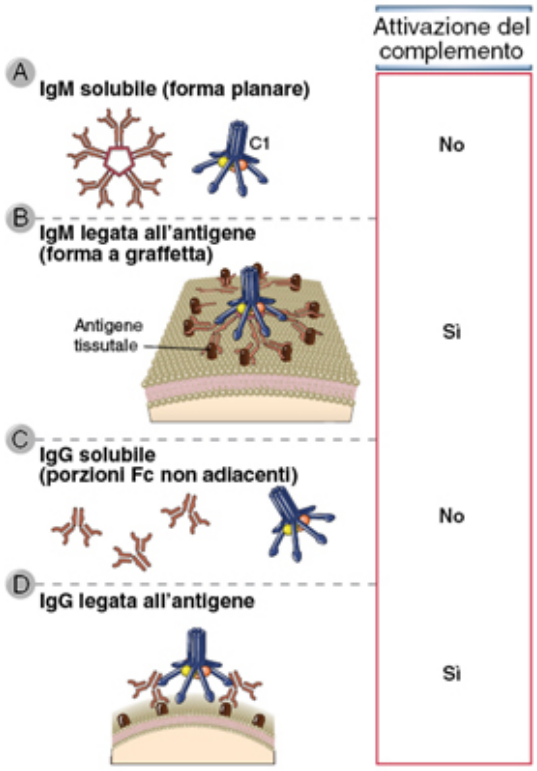


FIGURA 13-11 Legame della frazione C1 alle porzioni Fc delle IgM e delle IgG. Per innescare la cascata del complemento, la frazione C1 deve legarsi attraverso la sua subunità C1q a due o più porzioni Fc. Tali regioni non sono accessibili nella forma solubile delle IgM pentameriche (**A**). Quando però le IgM si legano alla superficie di un antigene multivalente, esse subiscono una modificazione conformazionale che "smaschera" le porzioni Fc permettendo loro di legare e attivare la C1 (**B**). Le IgG monomeriche solubili non attivano la C1, perché ciascuna di esse possiede una sola porzione Fc (**C**) ma, anche in questo caso, dopo il legame a un antigene multivalente, le porzioni Fc di diverse IgG adiacenti possono legarsi e attivare la C1 (**D**).

TABELLA 13-5 Proteine della via classica del complemento

Proteina	Struttura	Concentrazione nel siero (µg/ml)	Funzione
C1 ($C1qr_2s_2$)	750kD		Attiva la via classica
C1q	Esamero di 460 kD; tre coppie di catene (di 22, 23 e 24 kD)	75-150	Si lega alla porzione Fc dell'anticorpo che ha legato l'antigene, a cellule apoptotiche e a superfici cationiche

C1r	Dimero di 85-kD	50	Serina proteasi, attiva mediante taglio proteolitico C1s
C1s	Dimero di 85-kD	50	Serina proteasi, taglia C4 e C2
C4	210 kD, trimero di catene di 97, 75 e 33 kD	300-600	C4b si lega covalentemente alla superficie di un microbo o di una cellula, laddove si trova legato un anticorpo e il complemento è attivato C4b lega C2 permettendone il taglio da parte di C1s C4a stimola l'infiammazione (anafilotossina)
C2	Monomero di 102 kD	20	C2b è una serina proteasi e rappresenta la componente enzimatica delle C3 e C5 convertasi che clivano C3 e C5
C3	Vedi la Tabella 13-4		

Le subunità C1r e C1s sono serine proteasi che nel complesso proteico C1 sono organizzate a formare un tetramero contenente due molecole di ciascuna subunità ($C1r_2$-$C1s_2$). Il legame di due o più teste globulari della subunità C1q alle regioni Fc delle IgG o delle IgM porta all'attivazione della subunità C1r, che cliva la C1s attivandola (vedi Fig. 13-9). A sua volta, la C1s attivata va ad agire sulla componente successiva della cascata del complemento (C4) clivandola e generando così un frammento più piccolo, definito C4a, che viene rilasciato in fase fluida, dove svolge diverse attività biologiche (vedi più avanti). Il frammento più grande C4b presenta omologie strutturali con il frammento C3b, in quanto possiede, come quest'ultimo, un gruppo tioesterico

capace di formare legami esterici o amidici direttamente con la superficie dell'antigene o con l'anticorpo a esso complessato. Il legame covalente del frammento C4b garantisce che l'attivazione della via classica del complemento prosegua solo a stretto contatto con la superficie dell'antigene o con l'immunocomplesso. Un'altra componente del complemento, la C2, ha una forte tendenza a complessarsi con il frammento C4b e, in questa configurazione, viene tagliata dalla subunità C1s generando un frammento solubile chiamato C2b (la cui funzione è ignota) e un frammento più grande C2a che rimane fisicamente associato al C4b sulla superficie cellulare. (È importante notare che la nomenclatura dei due frammenti della frazione C2 risulta differente da quella di altre proteine complementari dove il frammento legato è chiamato frammento *a* e quello solubile frammento *b*, questo perché, per quanto riguarda la frazione C2, il frammento legato è quello più grande.) Il complesso C4b2a rappresenta la C3 convertasi della via classica, dotata della capacità di legare la frazione C3, clivandola. Più in dettaglio, il legame alla frazione C3 è mediato dal C4b, mentre l'azione proteolitica è mediata dal C2a. Il clivaggio della C3 porta alla generazione del frammento C3a (che rimane in fase fluida) e del C3b che invece può formare legami covalenti con la superficie del patogeno o con gli anticorpi a essa associati. In questa configurazione, il C3b può legarsi al fattore B potenziando così la formazione della C3 convertasi attraverso la via alternativa (vedi pagina precedente). Il risultato finale delle reazioni enzimatiche descritte consiste in un processo di amplificazione in cui, a partire da una singola molecola di C3 convertasi, si può arrivare alla deposizione di centinaia o migliaia di molecole del frammento C3b sulla superficie dove il processo di attivazione è stato innescato. Le tappe precoci delle vie di attivazione alternativa e classica sono molto simili. In effetti, la frazione C3 svolge nella via alternativa un ruolo simile a quello svolto dalla frazione C4 nella via classica e lo stesso parallelismo può essere esteso anche al fattore B e alla frazione C2.

Parte delle molecole del frammento C3b generate dalla C3 convertasi della via classica si legano alla convertasi stessa (così come avviene nella via alternativa), generando il complesso C4b2a3b che agisce da C5 convertasi della via classica, clivando la frazione C5 e innescando le tappe terminali del processo di attivazione del complemento.

Una via inusuale di attivazione del complemento, indipendente dagli anticorpi, ma che dipende da C1, viene attivata da residui saccaridici che legano una lectina presente sulla superficie cellulare, questa via è stata

descritta nel contesto delle infezioni da pneumococchi. I macrofagi della zona marginale della milza esprimono sulla loro superficie una lectina di tipo C, definita SIGN-R1, che può riconoscere il polisaccaride dello pneumococco e legare contemporaneamente anche la subunità C1q. Il legame multivalente della lectina SIGN-R1 al batterio intatto o a un suo polisaccaride attiva la via classica del complemento che determina il rivestimento dello pneumococco con il frammento C3b. Questo è un esempio di come una lectina di membrana possa attivare la via classica del complemento senza l'intervento degli anticorpi.

Attivazione della via lectinica

La via lectinica di attivazione del complemento si innesca in modo anticorpo-indipendente a partire dall'interazione dei polisaccaridi microbici con le lectine circolanti, come la lectina legante il mannosio (*Mannose/mannan-Binding Lectin, *MBL) o le ficoline (Tab. 13-6). Queste lectine solubili fanno parte della famiglia delle collectine e da un punto di vista strutturale ricordano la subunità C1q (vedi Fig. 4-10). La MBL, la L-ficolina e l'H-ficolina sono proteine plasmatiche; la M-ficolina è prevalentemente secreta da macrofagi tissutali attivati. La MBL è un membro della famiglia delle collectine e presenta un dominio *N*-terminale simile alla struttura del collageno e all'estremità *C*-terminale un residuo di riconoscimento di natura saccaridica (lectina). Le ficoline condividono la stessa struttura con un dominio *N*-terminale simile al collageno e un dominio C-terminale simile alla struttura del fibrinogeno. I domini simili al collageno determinano l'assemblaggio di strutture a tripla elica che possono formare oligomeri di ordine superiore. La MBL si lega ai residui di mannosio dei polisaccaridi; il dominio simile al fibrinogeno delle ficoline si lega ai glicani che contengono residui di *N*-acetilglucosammina. La MBL e le ficoline si legano a serine proteasi associate alla MBL (*Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Protease*, MASP) che comprendono MASP-1, MASP-2 e MASP-3 (vedi Tab. 13-6). Le proteine MASP hanno una struttura omologa a quella delle proteasi C1r e C1s e svolgono funzioni simili, quali il clivaggio delle frazioni C4 e C2 per attivare la via del complemento. Gli oligomeri formati da un elevato numero di molecole di MBL si associano tipicamente a MASP-1 e MASP-2, nonostante sia possibile osservare anche complessi MASP3/MASP2. La proteina MASP1(o la MASP3) può formare un complesso tetramerico con la

MASP2 simile a quello formato dalle subunità C1r e C1s; la MASP-2 rappresenta la proteasi che va a clivare le frazioni C4 e C2. Gli eventi conseguenti sono identici a quelli che avvengono nella via classica.

TABELLA 13-6 Proteine della via lectinica del complemento

Proteina	Struttura	Concentrazione nel siero (µg/ml)	Funzione
Lectina legante il mannosio	Trimeri elicoidali di catene di 32 kD	1-8	Agglutinina, opsonina, fissazione del complemento
M-ficolina (ficolina-1)	Trimeri elicoidali di catene di 34 kD che formano tetrameri	Non rilevabile	Agglutinina, opsonina, fissazione del complemento
L-ficolina (ficolina-2)	Trimeri elicoidali di catene di 34 kD che formano tetrameri	1-7	Agglutinina, opsonina, fissazione del complemento
H-ficolina (ficolina-3)	Trimeri elicoidali di catene di 34 kD che formano tetrameri	6-83	Agglutinina, opsonina, fissazione del complemento
MASP1	Omodimero di 90 kD; omologo a C1r/C1s	2-13*	Forma un complesso con MASP2 e con le collectine o con le ficoline e attiva MASP3
MASP2	Omodimero di 110 kD; omologo a C1r/C1s	2-13	Forma un complesso con le lectine, in particolare con la ficolina-3
MASP3	Omodimero di 76 kD; omologo a C1r/C1s	0,02-1,0	Si associa

	con le collectine o le ficoline e MASP1 per clivare C4

*Le concentrazioni pubblicate possono essere state influenzate dalla cross reattività degli anticorpi con MASP3; le concentrazioni di MASP3 derivano dall'uso di specifici anticorpi monoclonali. Si tratta per la maggior parte di proteine plasmatiche, a eccezione della M-ficolina, che è secreta dai macrofagi attivati.

Sequenza terminale di attivazione del complemento

Le C5 convertasi generate attraverso le vie alternativa, classica o lectinica innescano l'attivazione delle componenti terminali del sistema del complemento che portano alla formazione del MAC* (Membrane Attack Complex), *dotato di attività citolitica (Tab. 13-7 e Fig. 13-12). Le C5 convertasi tagliano la frazione C5 generando il frammento C5a (che rimane in fase fluida, dove esercita diversi effetti biologici; vedi più avanti) e il frammento C5b, che si associa invece alle altre proteine del complemento già legate alla superficie antigenica. Le restanti componenti della cascata del complemento (C6, C7, C8 e C9) sono strutturalmente correlate tra loro e prive di attività enzimatica. Il frammento C5b mantiene transitoriamente una conformazione capace di legare le frazioni C6 e C7 per formare il complesso C5b,6,7. In questa nuova configurazione, la frazione C7 (che è idrofobica) si inserisce all'interno del doppio strato lipidico delle membrane cellulari, dove agisce da recettore ad alta affinità per la frazione C8. Quest'ultima è composta da 3 catene, una delle quali si lega al complesso C5b,6,7 e forma un eterodimero covalente con la seconda catena; la terza catena si inserisce nel doppio strato lipidico della membrana, stabilizzando ulteriormente il complesso C5b,6,7,8 (più brevemente C5b-8) che si va formando. Il complesso C5b-8 ha una limitata capacità di lisare la cellula su cui si è stabilmente inserito. In effetti, la formazione di un MAC pienamente attivo richiede l'ulteriore legame del complesso C5b-8 all'ultima componente del sistema del complemento, definita C9. Quest'ultima è una proteina plasmatica che tende a polimerizzare in associazione con il complesso C5b-8, per formare pori nella membrana plasmatica. Questi pori sono del diametro di circa 100 Å e formano canali che permettono alle molecole di acqua e agli ioni di penetrare liberamente nella cellula. L'ingresso di acqua provoca il rigonfiamento osmotico e la lisi della cellula sulla cui superficie si è formato il MAC. La

componente C9 è strutturalmente simile alla perforina e i pori che forma sono morfologicamente simili a quelli dalla perforina, la proteina citolitica presente nei granuli dei linfociti T citotossici e delle cellule NK (vedi Cap. 11).

TABELLA 13-7 Proteine della sequenza terminale del complemento

Proteina	Struttura	Concentrazione nel siero (µg/ml)	Funzione
C5	Dimero di 190 kD (catene di 115 e 75 kD)	80	C5b innesca l'assemblaggio del MAC C5a stimola l'infiammazione (anafilotossina)
C6	Monomero di 110 kD	45	Componente del MAC: si lega a C5b e agisce da accettore per C7
C7	Monomero di 110 kD	90	Componente del MAC: si lega a C5b,6 e s'inserisce nella membrana lipidica
C8	Trimero di 155 kD (catene di 64, 64 e 22 kD)	60	Componente del MAC: si lega a C5b,6,7 e avvia il legame e la polimerizzazione di C9
C9	Monomero di 79 kD	60	Componente del MAC: si lega a C5b,6,7,8 e si polimerizza formando i pori della membrana

MAC *(Membrane Attack Complex)*, complesso di attacco alla membrana.

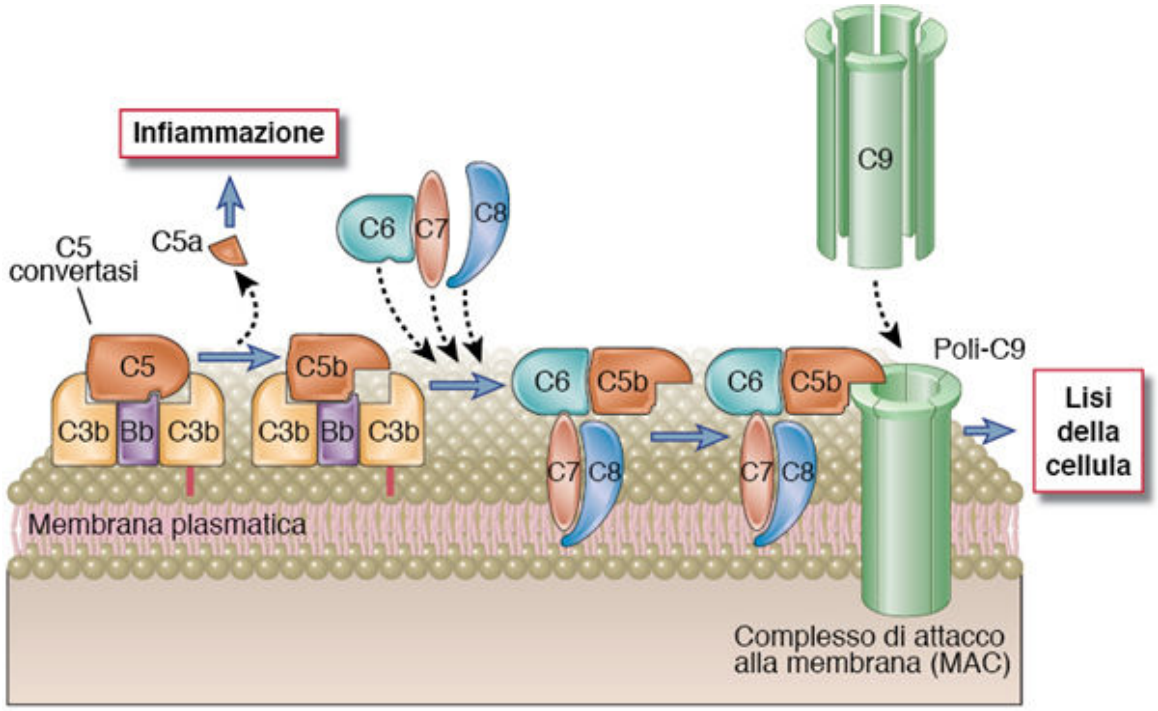


FIGURA 13-12 Tappe della sequenza terminale di attivazione del complemento e formazione del MAC. La C5 convertasi legata covalentemente alla cellula taglia la frazione C5 generando il frammento C5a (liberato in fase fluida per stimolare l'infiammazione) e il C5b che si associa alla convertasi stessa. Le frazioni C6 e C7 si legano in sequenza e il complesso C5b,6,7 si inserisce nel doppio strato lipidico della membrana plasmatica, a cui segue l'inserimento stabile di C8. Infine, numerose molecole della componente C9 (fino a 15) si polimerizzano attorno al complesso C5b-8 per formare il MAC, che crea pori nella membrana causando la lisi cellulare.

Recettori per le proteine del complemento

Molti degli effetti biologici del sistema del complemento sono dovuti al legame dei suoi componenti e/o dei suoi frammenti generati durante l'attivazione con i recettori espressi sulla membrana di vari tipi cellulari. Tra questi, quelli caratterizzati meglio sono i recettori per i frammenti della frazione C3 (vedi più avanti e Tab. 13-8). Altri recettori, tra i quali quelli per i frammenti C3a, C4a e C5a, sono coinvolti nella regolazione dell'infiammazione e altri recettori ancora regolano invece il processo di attivazione del complemento.

TABELLA 13-8 Recettori per i frammenti di C3

Recettore	Struttura	Ligandi	Distribuzione cellulare	Funzione
Recettore per il complemento di	160-250 kD; sequenze CCPR multiple	C3b > C4b > iC3b	Fagociti mononucleati,	Fagocitosi

tipo 1 (CR1, CD35)			neutrofili, linfociti B e T, eritrociti, eosinofili, FDC	Eliminazione degli immunocomplessi Promuove la dissociazione della C3 convertasi agendo da cofattore per il taglio di C3b e C4b
Recettore per il complemento di tipo 2 (CR2, CD21)	145-kD; sequenze CCPR multiple	C3d, C3dg > iC3b	Linfociti B, FDC, epitelio nasofaringeo	Corecettore per l'attivazione dei linfociti B Intrappolamento degli antigeni nei centri germinativi Recettore per EBV
Recettore per il complemento di tipo 3 (CR3, Mac-1, CD11bCD18)	Integrina; catena α di 165 kD e catena β2 di 95 kD	iC3b, ICAM-1; lega anche i microrganismi	Fagociti mononucleati, neutrofili, cellule NK	Fagocitosi Adesione dei leucociti all'endotelio (tramite ICAM-1)
Recettore per il complemento di tipo 4 (CR4, p150,95, CD11cCD18)	Integrina; catena α di 150 kD e catena β2 di 95 kD	iC3b	Fagociti mononucleati, neutrofili, cellule NK	Fagocitosi, adesione cellulare?
CCPR (*Complement Control Protein Repeat*), unità ripetitiva delle proteine di controllo del complemento; FDC (*Follicular Dendritic Cell*), cellula dendritica follicolare; ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), molecola di adesione intercellulare-1.				

- ***Il recettore per il complemento di tipo 1 (CR1 o CD35) svolge principalmente la funzione di promuovere la fagocitosi degli antigeni opsonizzati dai frammenti C3b o C4b e, più in generale, di garantire l'eliminazione degli immunocomplessi dal circolo***. CR1, recettore ad alta affinità per il C3b e il C4b, è espresso prevalentemente dalle cellule ematopoietiche come gli eritrociti, i neutrofili, i monociti, gli eosinofili e i linfociti T e B. È anche espresso dalle cellule follicolari dendritiche dei centri germinativi degli organi linfoidi secondari. Sulla superficie dei fagociti, CR1 lega gli antigeni opsonizzati dal C3b o dal C4b. Tale legame attiva inoltre una trasdurre che stimola i meccanismi microbicidi intracellulari associati alla fagocitosi. Ciò avviene specialmente quando,

oltre a CR1, anche il recettore Fcγ del fagocita è contemporaneamente attivato dagli antigeni opsonizzati dalle IgG. CR1 espresso sugli eritrociti lega gli immunocomplessi circolanti che hanno fissato il C3b e il C4b, assicurando così il loro trasporto al fegato e alla milza, dove i fagociti rimuovono gli immunocomplessi dalla superficie degli eritrociti, che possono così tornare in circolo. CR1 funge anche da regolatore dell'attivazione del complemento (vedi il paragrafo successivo).

- ***Il recettore per il complemento di tipo 2 (CR2 o CD21) stimola le risposte immunitarie umorali potenziando l'attivazione dei linfociti B da parte dell'antigene e favorendo l'intrappolamento degli immunocomplessi nei centri germinativi***. CR2 è espresso sulla superficie dei linfociti B, delle cellule follicolari dendritiche e di alcune cellule epiteliali. Esso lega specificamente i frammenti C3d, C3dg e iC3b (dove "i" sta per inattivo) generati dal taglio del frammento C3b operato dal fattore I (vedi più avanti). Nei linfociti B, CR2 è espresso in associazione a un complesso trimerico formato da altre due proteine legate non covalentemente e denominate CD19 e CD81 (o TAPA-1, *Target of AntiProliferative Antibody-1*). Questo complesso trasduce nei linfociti B i segnali che potenziano la risposta all'antigene (vedi Fig. 7-20). Quando è espresso dalle cellule follicolari dendritiche, CR2 favorisce l'intrappolamento degli immunocomplessi rivestiti dai frammenti iC3b e C3dg nei centri germinativi. Le funzioni del complemento nell'attivazione dei linfociti B verranno descritte più avanti.
- ***Il recettore per il complemento di tipo 3 (CR3, CD11bCD18 o Mac-1) è un'integrina che agisce da recettore per il frammento iC3b generato dal taglio del C3b***. Mac-1 è espresso sulla superficie dei neutrofili, dei fagociti mononucleati, dei mastociti e delle cellule NK, appartiene alla famiglia delle integrine (vedi Cap. 3) ed è costituito da una catena α (CD11b) associata non covalentemente α una catena β (CD18) che è identica alla catena β di due altre integrine strettamente correlate, LFA-1 (*Leukocyte Function-associated Antigen-1*) e p150,95. Nei neutrofili e nei monociti, Mac-1 promuove la fagocitosi dei microrganismi opsonizzati dal frammento iC3b. Inoltre, questo recettore è responsabile dell'interazione fagocita-microrganismo in assenza di opsonine, legandosi a molecole della superficie del microrganismo per ora sconosciute (vedi Cap. 4). Infine, Mac-1 lega la moleocola di adesione ICAM-1 (*IntraCellular Adhesion Molecule 1*) espressa sulla superficie delle

cellule endoteliali, favorendo l'adesione stabile dei leucociti all'endotelio anche in assenza dell'attivazione del complemento e promuovendo di conseguenza il reclutamento dei leucociti nel focolaio infiammatorio e/o nel tessuto danneggiato (vedi Cap. 3).

- Il ***recettore per il complemento di tipo 4*** (***CR4, p150,95, CD11cCD18) è un'altra integrina costituita dalla stessa catena β di Mac-1, ma da una diversa catena α (CD11c).*** Anche CR4 si lega al frammento iC3b, svolgendo probabilmente funzioni simili al recettore Mac-1. La catena CD11c è espressa abbondantemente sulla superficie delle cellule dendritiche e viene comunemente utilizzata come marcatore per identificare questo tipo cellulare.
- Il ***recettore per il complemento della famiglia delle immunoglobuline (CRIg) è espresso sulla superficie dei macrofagi residenti nel fegato (noti con il nome di cellule di Kupffer).*** CRIg è una proteina integrale di membrana con una regione extracellulare formata da un dominio Ig. Esso lega i frammenti C3b e iC3b e agisce principalmente da recettore per l'eliminazione dei batteri opsonizzati e di altri patogeni eventualmente presenti nel circolo sanguigno.

Regolazione dell'attivazione del complemento

L'attivazione della cascata del complemento e la stabilità dei suoi prodotti bioattivi sono strettamente regolate per impedire che l'attivazione avvenga sulla superficie di cellule normali dell'ospite e per limitarne la durata quando essa avviene sulla superficie dei microrganismi e degli immunocomplessi. La regolazione dell'attivazione del complemento è garantita da diverse proteine circolanti e di membrana (Tab. 13-9). Molte di queste proteine, nonché varie componenti della via classica e di quella alternativa, appartengono alla famiglia delle proteine che regolano l'attivazione del complemento (*Regulators of Complement Activity*, RCA) e sono codificate da geni omologhi adiacenti tra loro nel genoma.

TABELLA 13-9 Proteine che regolano il sistema di attivazione del complemento

Recettore	Struttura	Distribuzione	Interagisce con	Funzione
Inibitore del (C1 INH)	104 kD	Proteina plasmatica;	C1r, C1s	Inibitore delle serina proteasi; si

		conc. 200 µg/ml		lega a C1r e a C1s e li dissocia da C1q
Fattore I	Dimero di 88 kD (subunità di 50 e di 38 kD)	Proteina plasmatica; conc. 35 µg/ml	C4b, C3b	Serina proteasi; cliva C3b e C4b usando come cofattori il fattore H, MCP, C4BP o CR1
Fattore H	150 kD; CCPR multiple	Proteina plasmatica; conc. 480 µg/ml	C3b	Lega C3b e spiazza Bb Cofattore per il taglio di C3b da parte del fattore I
Proteina che lega C4 (C4BP)	570 kD; CCPR multiple	Proteina plasmatica; conc. 300 µg/ml	C4b	Lega C4b e spiazza C2 Cofattore per il taglio di C4b da parte del fattore I
Proteina cofattoriale di membrana (MCP CD46)	45-70 kD; quattro CCPR	Leucociti, cellule epiteliali, cellule endoteliali	C3b, C4b	Cofattore per il taglio di C3b e C4b da parte del fattore I
Fattore accelerante la degradazione (DAF)	70 kD; legato a GPI, quattro CCPR	Cellule ematiche, cellule endoteliali, cellule epiteliali	C4b2a, C3bBb	Spiazza C2a da C4b e Bb da C3b (dissociazione della C3 convertasi)
CD59	18 kD; legato a GPI	Cellule ematiche, cellule endoteliali, cellule epiteliali	C7, C8	Blocca il legame di C9 e previene la formazione del MAC

CCPR (*Complement Control Protein Repeat*), unità ripetitiva delle proteine di controllo del complemento; conc., concentrazione; GPI (*GlycoPohospahatidyInositolo*), glicofosfatidilinositolo; MAC (*Membrane Attack Complex*), complesso di attacco alla membrana.

L’attivazione del complemento deve essere attentamente controllata per almeno due ragioni. Abbiamo già descritto come, anche in condizioni fisiologiche, il complemento abbia un livello di attivazione costitutiva. Se tale attivazione avvenisse sulla superficie delle cellule normali dell’ospite, queste ne risulterebbero danneggiate. D’altra parte, anche quando l’attivazione del complemento avviene dove necessario (per esempio sulla superficie di un microrganismo o sugli immunocomplessi), essa deve essere comunque controllata, poiché i suoi prodotti bioattivi potrebbero diffondere alle cellule adiacenti dell’ospite, danneggiandole. Diversi meccanismi impediscono la formazione della C3 convertasi nelle fasi precoci di attivazione oppure degradano e inattivano la C3 convertasi e la C5 convertasi oppure ancora inibiscono la formazione del MAC nelle fasi tardive dell’attivazione.

- ***L’attività proteolitica delle subunità C1r e C1s viene inibita da una proteina plasmatica chiamata C1 INH* (C1 inhibitor)**. C1 INH è un inibitore delle serina proteasi appartenente alla famiglia delle serpine che agisce mimando il normale substrato delle subinità C1r e C1s. Nel caso in cui la C1q inizi l’attivazione del complemento legandosi a un anticorpo in fase fluida, la proteina C1 INH diviene il principale bersaglio dell’attività enzimatica delle subunità C1r e C1s. Il conseguente taglio di C1 INH porta alla sua associazione covalente al tetramero $C1r_2$-$C1s_2$ che si dissocia dalla C1q bloccando l’attivazione del complemento (Fig. 13-13). In questo modo, C1 INH previene l’accumulo nel plasma di molecole del complesso $C1r_2$-$C1s_2$ enzimaticamente attive, limitandone la disponibilità per l’attivazione delle tappe successive della cascata complementare. Il deficit di C1 INH causa una malattia ereditaria autosomico-dominante, chiamata **edema angioneurotic oereditario**, caratterizzata da episodi intermittenti di edema della cute e delle mucose che provocano dolori addominali, vomito, diarrea e ostruzione delle vie aeree potenzialmente letale. In questi pazienti, i livelli plasmatici di C1 INH sono ridotti (20-30% rispetto alla norma). Tale riduzione è sufficiente affinché l’attivazione della frazione C1 da parte degli immunocomplessi non possa più essere adeguatamente controllata e si verifichi un incontrollato taglio delle frazioni C4 e C2. In effetti, è stato dimostrato che nell’edema angioneurotico ereditario i principali mediatori molecolari sono proprio un frammento proteolitico della C2, denominato *C2* chinina, e la bradichinina. È interessante notare che C1 INH agisce da inibitore anche

di altre serine proteasi plasmatiche, come la callicreina e il fattore XII della coagulazione, ed entrambe queste proteasi promuovono la formazione di bradichinina. Oggi i pazienti affetti da questo deficit vengono trattati con C1 INH ricombinante.

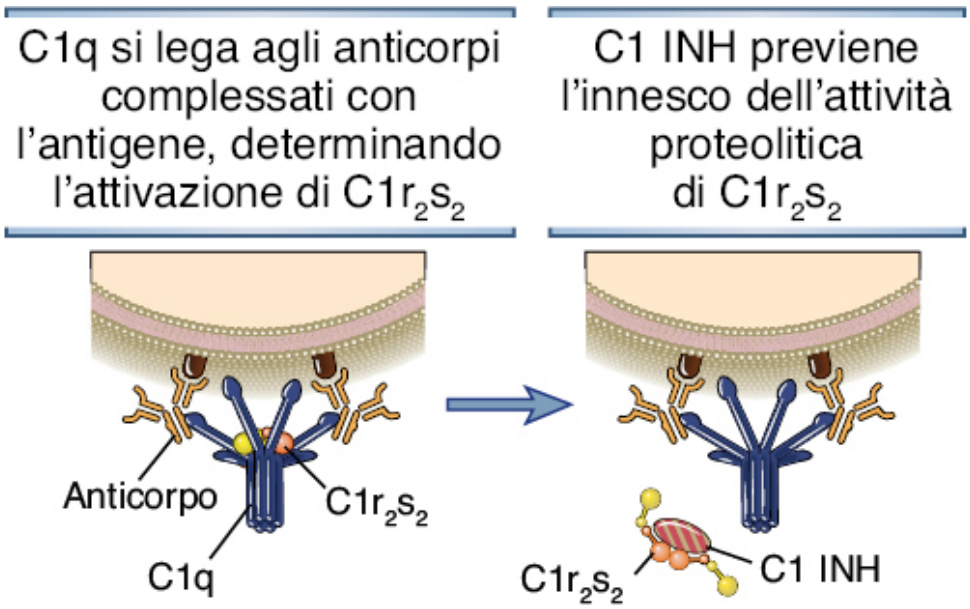


FIGURA 13-13 Regolazione dell'attivazione della frazione C1 da parte del suo inibitore (C1 INH). La proteina C1 INH spiazza il complesso $C1r_2$-$C1s_2$ dalla subunità C1q, bloccando l'attivazione della via classica.

- ***L'assemblaggio delle componenti della C3 convertasi e della C5 convertasi può essere inibito dal legame delle proteine inibitorie ai frammenti C3b e C4b associati covalentemente alla superficie cellulare*** (Fig. 13-14). Quando il frammento C3b si associa alla superficie di cellule normali dell'ospite, può essere legato da una proteina plasmatica chiamata fattore H e/o da diverse proteine di membrana, tra le quali MCP (*Membrane Cofactor Protein*), definita anche CD46, CR1 e DAF (*Decay-Accelerating Factor*). Analogamente, il frammento C4b associato alla superficie cellulare può essere legato da DAF, CR1, MCP e da una diversa proteina plasmatica chiamata C4BP (*C4 Binding Protein*). Legandosi al C3b o al C4b, tali proteine impediscono il legame degli altri componenti della C3 convertasi, come il Bb della via alternativa e il C2a della via classica, bloccando così la prosecuzione della cascata complementare (in particolare, inibendo specificamente il legame del Bb con il C3b, il fattore H regola solo la via alternativa, ma non quella

classica). Le proteine MCP, CR1 e DAF sono espresse sulla superficie di cellule di mammifero, ma non sulla parete dei batteri; di conseguenza, impediscono selettivamente l'attivazione del complemento sulle cellule dell'ospite, ma non sui microrganismi. Infine, un ulteriore meccanismo di controllo, che fa in modo che l'attivazione del complemento avvenga specificamente sulla superficie dei microrganismi e non su quella delle cellule dell'ospite, è rappresentato dal fatto che superfici cellulari ricche in acido sialico, come quelle dei mammiferi, favoriscono il legame del frammento C3b al fattore H invece che al fattore B.

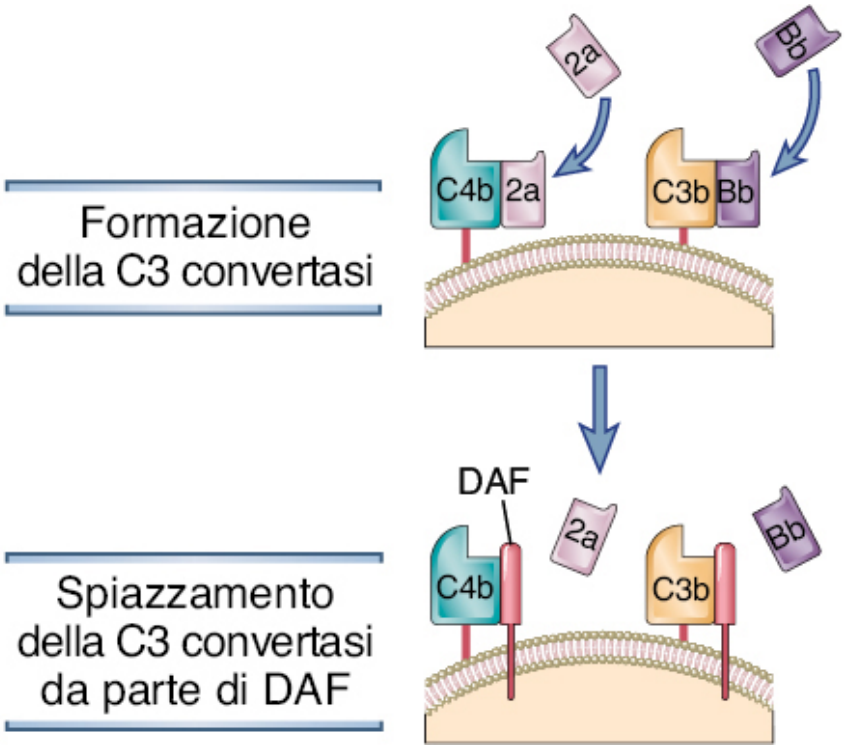


FIGURA 13-14 Inibizione della formazione della C3 convertasi. La C3 convertasi della via classica (C4b2a) o la C3 convertasi della via alternativa (C3bBb) possono essere inibite tramite la sostituzione di un loro componente con DAF (*Decay-Accelerating Factor*). Altre proteine regolatorie, come MCP e CR1, svolgono una funzione simile a DAF (vedi il testo).

- ***Il frammento C3b legato covalentemente alla cellula può essere degradato da una serina proteasi plasmatica chiamata fattore I, che è in grado di svolgere tale compito solo in presenza delle proteine regolatorie sopra elencate*** (Fig. 13-15). In effetti, MCP, il fattore H, C4BP e CR1 agiscono da cofattori per il taglio dei frammenti C3b e C4b operato dal fattore I. Pertanto, queste proteine regolatorie sono al contempo responsabili della dissociazione dei complessi contenenti C3b e

C4b (vedi sopra) e della loro degradazione proteolitica. Il taglio del C3b operato dal fattore I genera frammenti denominati iC3b, C3d e C3dg che non partecipano all'attivazione del complemento e possono essere riconosciuti dai recettori espressi dai fagociti e dai linfociti B.

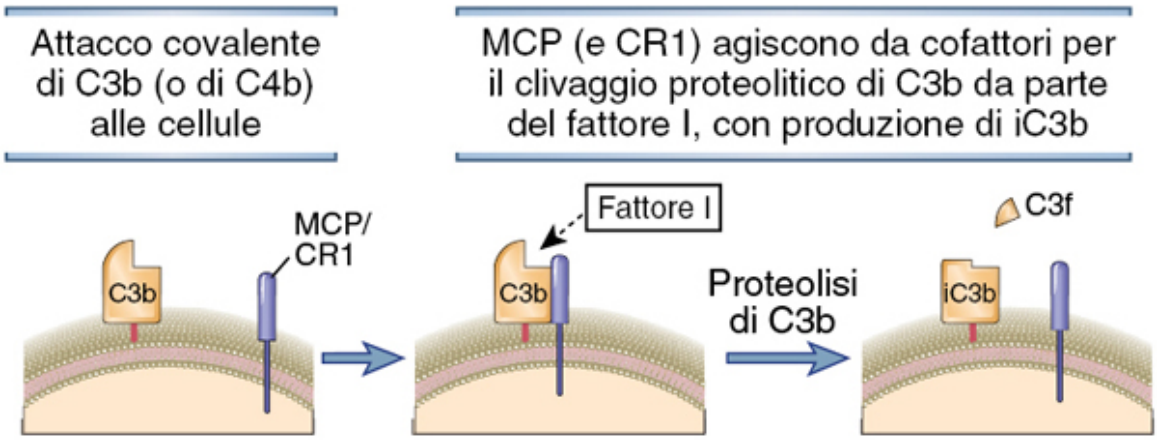


FIGURA 13-15 Taglio proteolitico del frammento C3b da parte del fattore I. In presenza di cofattori espressi sulla superficie delle cellule dell'ospite (MCP o CR1), il fattore I taglia il C3b associato covalentemente alla superficie cellulare generando il frammento C3b inattivo (iC3b). Anche il fattore H e C4BP (non mostrati in figura) possono fungere da cofattori per il taglio del C3b da parte del fattore I. Lo stesso tipo di regolazione può avvenire anche la frazione C4.

- ***La formazione del MAC è inibita da una proteina di membrana chiamata CD59***, espressa da molti tipi cellulari come proteina legata alla membrana plasmatica attraverso un residuo di glicofosfatidilinositolo. Essa può incorporarsi nel MAC dopo l'inserimento in membrana del C5b-8, inibendo così il successivo assemblaggio della frazione C9 (vedi Fig. 13-16). CD59 è selettivamente espressa dalle cellule dell'ospite, dove limita la formazione del MAC, ma non dai microrganismi. La formazione del MAC può essere inibita anche da proteine plasmatiche come la proteina S, che agisce legandosi ai complessi solubili C5b,6,7 prevenendone l'inserimento nelle membrane cellulari nelle quali non sta avvenendo l'attivazione del complemento. Bisogna infatti tenere conto della possibilità che i complessi MAC che si stanno formando vadano a inserirsi nella membrana di cellule dell'ospite adiacenti a quella in cui si è innescata l'attivazione complementare. Gli inibitori plasmatici del MAC o quelli espressi sulle membrane delle cellule dell'ospite garantiscono quindi che non si verifichi la lisi delle cellule adiacenti non direttamente interessate dall'attivazione del complemento.

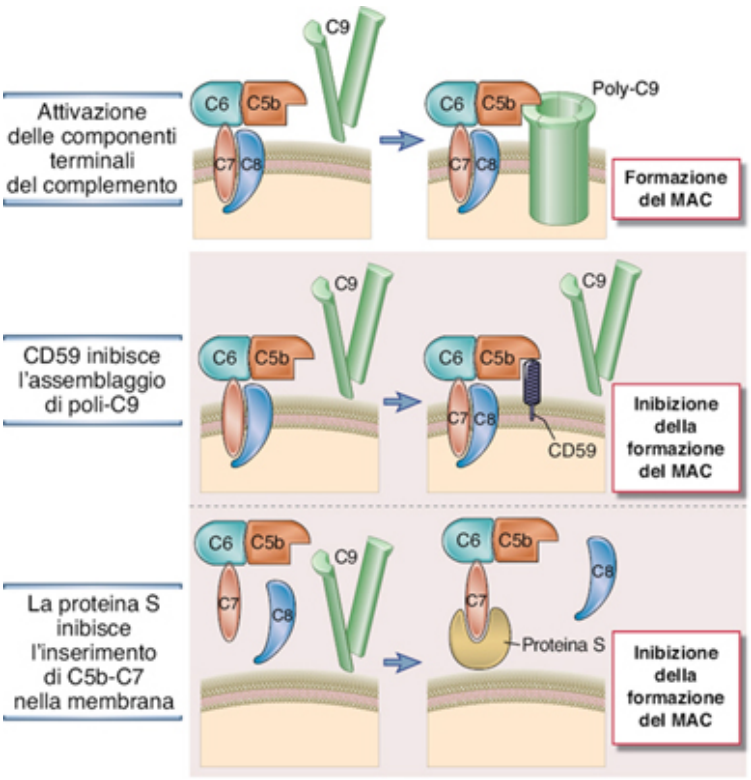


FIGURA 13-16 Regolazione della formazione del MAC. Il MAC si forma sulla superficie di una cellula a conclusione del processo di attivazione del complemento. Il suo assemblaggio può essere inibito dalla proteina di membrana CD59 e dalla proteina S circolante.

Molte delle ricerche svolte riguardo ai meccanismi d'azione delle proteine regolatorie del complemento sono state condotte principalmente *in vitro* utilizzando un sistema di rilevamento che misura la lisi cellulare indotta dal MAC. Si è potuta così delineare una sorta di gerarchia dell'importanza delle diverse proteine che inibiscono l'attivazione del complemento: secondo tale gerarchia, la proteina più importante sembrerebbe essere CD59, seguita da DAF e infine da MCP. È probabile che tale gerarchia rifletta le relative concentrazioni di queste proteine sulla superficie cellulare.

Un incremento abnorme dell'attivazione del complemento può rendere inefficace l'azione delle proteine regolatorie. Va ricordato che, sebbene si siano fin qui enfatizzate l'importanza e l'efficienza delle proteine regolatorie nell'inibire l'attivazione del complemento sulle cellule dell'ospite, la fagocitosi mediata dal complemento e il danno alle cellule dell'ospite riescono comunque a contribuire significativamente alla patogenesi di molte malattie a base immunologica (vedi Cap. 19). Ciò avviene perché in tali malattie elevate quantità di anticorpi tendono a depositarsi sulle cellule dell'ospite, generando

un numero tale di frammenti bioattivi del complemento da non poter più essere controllati dalle proteine regolatorie.

Funzioni del complemento

Le principali funzioni svolte dal sistema del complemento nell'ambito delle risposte immunitarie umorali specifiche e innate sono: promuovere la fagocitosi e/o la lisi dei microrganismi e stimolare l'infiammazione. Inoltre, i prodotti di attivazione del complemento forniscono il cosiddetto segnale accessorio per l'attivazione dei linfociti B e la conseguente produzione di anticorpi. La fagocitosi, l'infiammazione e l'attivazione dell'immunità umorale sono tutte regolate dal legame dei frammenti del complemento a diversi recettori di superficie, mentre la lisi cellulare è dovuta al MAC. Nei paragrafi seguenti descriveremo ciascuna di queste funzioni e il loro ruolo nella difesa dell'ospite.

Opsonizzazione e fagocitosi

I microrganismi che hanno provocato l'attivazione della via alternativa o di quella classica del complemento vengono opsonizzati dai frammenti C3b, iC3b o C4b e vengono fagocitati attraverso l'interazione di queste proteine con recettori specifici espressi su macrofagi e neutrofili (Fig. 13-17, *A*). Come descritto precedentemente, l'attivazione delle vie alternativa e classica del complemento porta alla generazione dei frammenti C3b e iC3b e al loro legame covalente alla superficie cellulare. In questa configurazione, entrambi i frammenti agiscono da opsonine che vengono riconosciute in modo specifico dai recettori espressi sulla superficie dei neutrofili e dei macrofagi. I frammenti C3b e C4b (quest'ultimo generato solo attraverso la via classica) si legano a CR1, mentre l'iC3b si lega a CR3 (Mac-1) e a CR4. Il solo legame dei frammenti C3b e C4b a CR1 non è in grado di promuovere efficientemente la fagocitosi dei microrganismi opsonizzati, ma la sua efficienza in tal senso aumenta sensibilmente se i microrganismi sono anche opsonizzati dalle IgG che si legano simultaneamente ai recettori Fcγ espressi dai fagociti. Anche una contemporanea attivazione dei macrofagi da parte dell'IFN-γ potenzia la fagocitosi mediata da CR1. La fagocitosi dei microrganismi promossa dai frammenti C3b e iC3b è uno dei principali meccanismi di difesa contro le infezioni per quanto riguarda sia l'immunità innata sia quella specifica. L'importanza del complemento nella difesa dell'ospite è dimostrata dalle

risposte contro batteri dotati di capsula ricca di polisaccaridi (come gli pneumococchi e i meningococchi), che avvengono essenzialmente con meccanismi umorali. Infatti, le IgM dirette contro i polisaccaridi della capsula si legano ai batteri e attivano la via classica del complemento causando l'eliminazione dei batteri stessi mediante fagocitosi a livello splenico. Ecco perché i soggetti splenectomizzati (per esempio i pazienti che hanno subito una asportazione chirurgica in seguito a una rottura traumatica o i pazienti con anemia emolitica autoimmune o trombocitemia) sono più suscettibili a setticemie pneumococciche e meningococciche. Inoltre, anche un deficit della frazione C3 aumenta la sucettibilità alle infezioni batteriche letali sia nell'uomo sia in modelli murini.

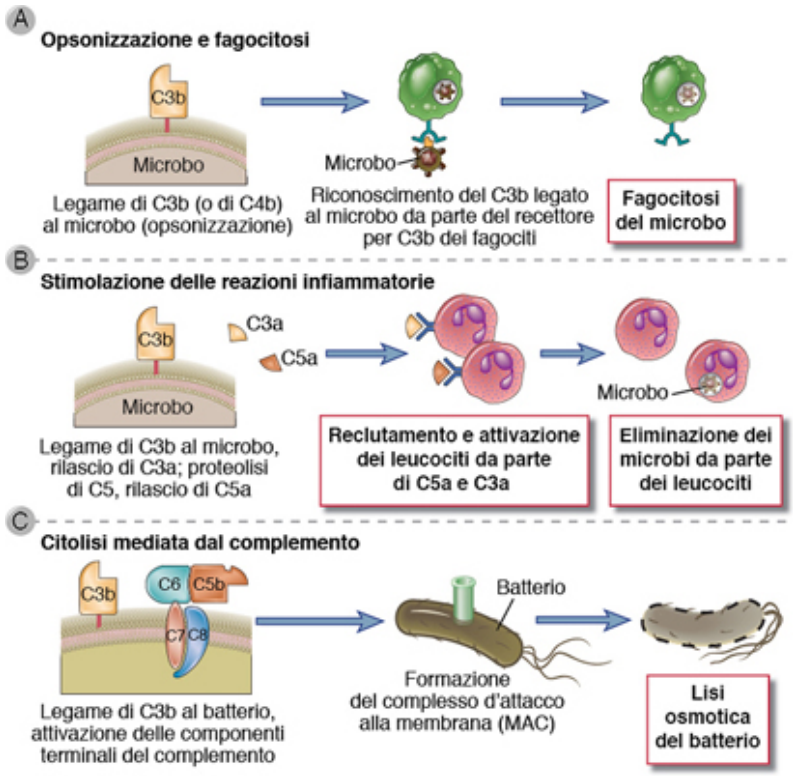


FIGURA 13-17 Funzioni biologiche del complemento. Nella figura sono schematizzate le principali funzioni biologiche svolte dal complemento nella difesa dell'ospite: quando è legato al microrganismo, il frammento C3b agisce da opsonina promuovendone la fagocitosi (**A**); i frammenti C5a, C3a e, in minore misura, C4a stimolano il reclutamento dei leucociti e l'infiammazione (**B**); il MAC causa la lisi del microrganismo (**C**).

Attivazione della risposta infiammatoria

I frammenti del complemento C3a, C4a e C5a inducono un'infiammazione acuta agendo su mastociti, neutrofili e cellule endoteliali (vedi Fig. 13-17, *B*). Questi tre frammenti del complemento si legano ai mastociti e ne inducono la degranulazione, con conseguente liberazione di mediatori vasoattivi come l'istamina. Questi frammenti vengono anche definiti **anafilotossine** poiché le reazioni che scatenano a livello dei mastociti riproducono il processo di anafilassi (vedi Cap. 20). Nei neutrofili, il frammento C5a stimola la motilità e l'adesione stabile all'endotelio e, a dosi elevate, il burst ossidativo, con conseguente produzione di ROS. Inoltre, il C5a può agire direttamente sulle cellule endoteliali vascolari aumentando la permeabilità vascolare e l'espressione della P-selectina, che favorisce l'adesione dei neutrofili alle cellule endoteliali stesse. La capacità del C5a di agire in modo coordinato su mastociti, neutrofili e cellule endoteliali potenzia il processo infiammatorio nelle sedi in cui si stia verificando l'attivazione del complemento. Il frammento C5a è il più potente induttore della degranulazione dei mastociti, mentre il C3a e il C4a sono, rispettivamente, circa 20 e 2500 volte meno potenti. Gli effetti proinfiammatori dei frammenti C3a, C4a e C5a sono dovuti al loro legame a specifici recettori espressi sulla superficie di vari tipi cellulari. Quello per il C5a è il meglio caratterizzato: è un membro della famiglia dei recettori associati alle proteine G. Il recettore per il C5a è espresso da diversi tipi cellulari, inclusi neutrofili, eosinofili, basofili, monociti, macrofagi, mastociti, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, cellule epiteliali e astrociti. Il recettore per il C3a appartiene anch'esso alla famiglia dei recettori a sette domini ad α-elica transmembrana che utilizzano proteine G.

Citolisi mediata dal complemento

La lisi dei microrganismi da parte del complemento è dovuta al MAC (vedi Fig. 13-17, *C*). La maggior parte dei patogeni si sono evoluti acquisendo la capacità di formare pareti cellulari spesse o capsule che impediscono l'accesso del MAC alla loro membrana plasmatica. In quest'ottica, la lisi da complemento sembra essere importante solo per la difesa contro quei pochi patogeni che non sono in grado di opporsi all'inserzione del MAC nella membrana plasmatica. Ne consegue che i difetti genetici nella sintesi dei diversi componenti del MAC si traducono in un aumento della suscettibilità solo verso alcuni batteri, come quelle del genere *Neisseria*, che sono caratterizzati da una parete batterica molto sottile.

Altre funzioni del sistema del complemento

Legandosi agli immunocomplessi, le proteine del complemento ne favoriscono la solubilizzazione e l'eliminazione da parte dei fagociti. Quando un individuo sviluppa una risposta anticorpale verso un antigene presente in circolo, solitamente si produce una piccola quantità di immunocomplessi circolanti. Se la quantità degli immunocomplessi ematici è sufficientemente grande, essi possono depositarsi a livello della parete vascolare provocando reazioni infiammatorie e danno tissutale. La formazione di questi immunocomplessi richiede non solo il legame delle regioni Fab agli antigeni multivalenti, ma anche un'interazione non covalente tra le regioni Fc delle Ig adiacenti. L'attivazione del complemento in corrispondenza delle Ig può interferire stericamente con queste interazioni tra Ig, favorendo la dissociazione degli immunocomplessi. Inoltre, come descritto in precedenza, gli immunocomplessi associati al frammento C3b si legano a CR1 espresso dagli eritrociti favorendone l'eliminazione mediante il trasporto ai fagociti epatici.

La proteina C3d, che deriva dal taglio della frazione C3, si lega a CR2, espresso dai linfociti B, attivandoli e fornendo loro un segnale per l'avvio della risposta umorale. Il frammento C3d può generarsi quando il complemento è attivato direttamente da un antigene (per esempio quando l'antigene è rappresentato da un polisaccaride microbico) o quando l'antigene è riconosciuto dall'anticorpo. L'attivazione del complemento porta al legame covalente del frammento C3b e del C3d all'antigene e in questo modo i linfociti B hanno la possibilità di legarsi agli antigeni sia attraverso le loro Ig di membrana sia attraverso CR2. Quest'ultimo, che agisce da corecettore per il complesso recettoriale dei linfociti B (BCR), riconosce il C3d associato alla superficie del patogeno, rendendo più efficiente la trasduzione del segnale per l'attivazione dei linfociti B (vedi Cap. 12). Inoltre, nei centri germinativi degli organi linfoidi secondari, gli antigeni opsonizzati possono essere catturati dalle cellule follicolari dendritiche per essere presentati ai linfociti B. Tale processo è importante per la selezione dei linfociti B a elevata affinità per l'antigene (vedi Fig. 12-9). Il ruolo fondamentale svolto dal complemento nelle risposte immunitarie umorali è chiaramente evidenziato dalle gravi alterazioni dello sviluppo dei centri germinativi e della produzione di anticorpi che si osservano in topi knockout per i geni che codificano per le frazioni C3 e C4 e per il recettore CR2.

Deficit del complemento

I difetti genetici nella sintesi delle proteine del complemento e delle proteine regolatorie sono la causa di varie malattie. Sono stati descritti diversi deficit ereditari e spontanei a carico di molte frazioni del complemento.

- Sono stati descritti deficit genetici a carico delle componenti della via classica C1q, C1r, C4, C2 e C3. Il deficit della frazione C2 è il più frequente. Inoltre più del 50% dei pazienti con deficit delle frazioni C1q, C2 e C4 sviluppa una sindrome simile al lupus eritematoso sistemico, una malattia autoimmune. Le ragioni di tale associazione sono sconosciute, ma si suppone che i deficit del complemento possano comportare un'insufficiente eliminazione degli immunocomplessi circolanti. In effetti, se non adeguatamente rimossi dal circolo, gli immunocomplessi tendono a depositarsi sulle pareti dei vasi e nei tessuti, dove, legando gli FcR, attivano i leucociti innescando il processo infiammatorio. Il complemento può svolgere un ruolo importante anche nell'eliminazione dei corpi apoptotici contenenti il DNA frammentato. Questo materiale di degradazione cellulare è attualmente incriminato come una delle probabili fonti di antigeni nucleari in grado di scatenare la risposta anticorpale autoreattiva nel lupus. Inoltre, bisogna ricordare che alcune proteine del complemento regolano la trasduzione del segnale del recettore per l'antigene nei linfociti B; in assenza di tale regolazione, ci può essere un difetto di tolleranza dei linfociti B e l'innesco di una risposta autoimmunitaria. Sorprendentemente, i deficit delle frazioni C2 e C4 non si accompagnano solitamente a un'aumentata suscettibilità alle infezioni. Questo suggerisce che la via alternativa e le risposte infiammatorie attivate dagli FcR sono sufficienti a garantire la difesa dell'ospite contro la maggior parte dei microrganismi. Il deficit della C3 si accompagna a infezioni gravi e ricorrenti da batteri piogeni, spesso fatali. Quest'osservazione mette in evidenza il ruolo cruciale svolto da questa componente nei fenomeni di opsonizzazione e nel potenziamento della fagocitosi e dell'eliminazione di questi batteri.
- Deficit dei componenti della via alternativa. Sono stati descritti deficit a carico della properdina e del fattore D, che si traducono in un'aumentata suscettibilità alle infezioni da batteri piogeni, in modo simile a quanto appena descritto per la frazione C3. Una mutazione del gene che codifica

per la lectina MBL contribuisce allo sviluppo di alcune immunodeficienze (vedi Cap. 21).

- Deficit delle componenti della sequenza terminale sono stati descritti a carico delle frazioni C5, C6, C7, C8 e C9. È interessante notare, come già menzionato, che l'unica seria ripercussione clinica di questi deficit è una tendenza a sviluppare infezioni disseminate da *Neisseria* spp. (*N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae*). Ciò suggerisce che la lisi mediata dal complemento è cruciale per la difesa contro questi microrganismi patogeni.
- I deficit delle proteine regolatorie del complemento si associano a un'attivazione incontrollata del complemento e a una varietà di alterazioni cliniche a essa correlate. I deficit della proteina DAF e dell'inibitore della frazione C1 sono già stati menzionati in precedenza. Il deficit del fattore I determina un consumo aberrante della frazione C3 come risultato di una formazione incontrollata della C3 convertasi in fase fluida (attraverso il cosiddetto meccanismo di *tickover*). La conseguenza clinica di tale deficit consiste nell'aumento della suscettibilità alle infezioni da batteri piogeni. Il deficit del fattore H è estremamente raro e causa un eccesso di attivazione della via alternativa e un conseguente eccessivo consumo di C3. Le manifestazioni cliniche consistono in glomerulonefriti provocate dall'eliminazione inadeguata degli immunocomplessi che tendono a depositarsi a livello renale. È stata descritta una forma atipica della sindrome uremica-emolitica associata a deficit delle proteine regolatorie, la cui principale mutazione riguarda il gene del *fattore H*. Inoltre, specifiche varianti alleliche del fattore H sono strettamente associate alla degenerazione maculare correlata all'età. Le manifestazioni cliniche dei deficit del fattore I o del fattore H sono simili a quelle causate da un autoanticorpo definito fattore nefritogeno (C3NeF) diretto contro la C3 convertasi della via alternativa (C3bBb). Il C3NeF stabilizza il complesso C3bBb proteggendolo dalla dissociazione favorita dal fattore H, causando di conseguenza un eccessivo consumo della frazione C3. I pazienti che presentano in circolo tali anticorpi sviluppano spesso glomerulonefriti, verosimilmente causate dall'inadeguata eliminazione degli immunocomplessi circolanti e depositati a livello renale.
- Deficit dei recettori del complemento sono stati descritti a carico dei recettori CR3 e CR4, entrambi causati da una rara mutazione nel gene che

codifica per la catena β (CD18) comune alla famiglia delle integrine CD11/CD18. La malattia causata da questa alterazione genetica è definita deficit dell'adesione leucocitaria (vedi Cap. 20) ed è caratterizzata da infezioni ricorrenti da batteri piogeni, determinate dall'incapacità dei neutrofili di aderire all'endotelio e di localizzarsi nei focolai di infezione, oltre che, probabilmente, da alterazioni della fagocitosi dei batteri opsonizzati dal frammento iC3b.

Effetti patologici della normale funzione del complemento

Il sistema del complemento può causare significativi danni tissutali, anche quando viene correttamente attivato e regolato. In effetti, alcune manifestazioni patologiche delle infezioni batteriche possono essere dovute alle risposte infiammatorie mediate dal complemento. In alcuni casi, l'attivazione del complemento si accompagna alla trombosi intravascolare e può portare a un danno ischemico a carico dei tessuti. Per esempio, gli anticorpi diretti contro l'endotelio di organi trapiantati e neovascolarizzati e gli autoanticorpi prodotti nel corso di malattie autoimmuni possono fissarsi all'endotelio vascolare e attivare il complemento, portando a infiammazione, formazione del MAC e quindi a un danno endoteliale esteso che innesca il processo coagulativo in modo abnorme. Alcuni dati suggeriscono inoltre che alcune componenti della sequenza terminale del complemento possano attivare le protrombinasi circolanti, in grado di innescare la trombosi indipendentemente dal danno endoteliale indotto dal MAC. Nella nefropatia membranosa, una nefropatia mediata da autoanticorpi, un danno parziale a carico delle cellule epiteliali glomerulari può essere dovuto al MAC generato a seguito del legame degli anticorpi agli autoantigeni glomerulari. In questa malattia non vi è infiammazione o presenza in circolo di immunocomplessi, e il danno glomerulare è una conseguenza dell'attivazione del complemento.

Gli esempi classici di processi patologici mediati dal complemento sono le manifestazioni che caratterizzano le malattie da immunocomplessi. La vasculite sistemica e le glomerulonefriti sono causate dalla massiva deposizione di immunocomplessi nella parete dei vasi e nei glomeruli renali (vedi Cap. 19). Il complemento attivato dagli immunocomplessi precipitati in queste sedi innesca una risposta infiammatoria che danneggia la parete vascolare, o i glomeruli, con conseguente trombosi, danno ischemico e fibrosi tissutale. Come già accennato, tuttavia, studi condotti con topi knockout per i

geni che codificano per le frazioni C3 o C4 o per i recettori Fcγ suggeriscono che l'attivazione dei leucociti da parte degli FcR può causare infiammazione e danno tissutale conseguenti alla deposizione di IgG anche in assenza di attivazione del complemento.

Elusione del complemento da parte dei microrganismi

I microrganismi patogeni hanno evoluto diversi meccanismi per sfuggire al sistema del complemento. In alcuni casi, essi hanno sviluppato spesse pareti cellulari che impediscono il legame delle proteine del complemento (principalmente quello del MAC) alla loro membrana plasmatica. I batteri Gram-positivi e alcuni funghi sono validi esempi di microrganismi che utilizzano questa strategia di elusione immunologica relativamente aspecifica. Di seguito prenderemo invece in considerazione quelle poche, ma più specifiche, strategie di elusione adottate da un ristretto numero di patogeni e che possono essere suddivise in tre gruppi.

- ***I microrganismi possono sfuggire al complemento causando l'accumulo locale di proteine regolatorie prodotte dall'ospite***. Molti patogeni esprimono sulla loro superficie l'acido sialico che può inibire la via alternativa del complemento legando il fattore H che causa il distacco del frammento C3b dal Bb. Tra questi, gli schistosomi, *Neisseria gonorrhoeae* e alcune specie di *Haemophilus* staccano i residui di acido sialico dalle cellule dell'ospite fissandoli enzimaticamente sulla propria superficie. Altri patogeni (tra i quali *Escherichia coli K1* e alcuni meningococchi) hanno invece evoluto vie biosintetiche proprie per la generazione di acido sialico. Invece dell'acido sialico, alcuni microrganismi sintetizzano particolari proteine in grado di legare il fattore H sulla propria superficie. È il caso della gp41 sulla superficie del virus dell'immunodeficienza umana (*Human Immunodeficiency Virus*, HIV) che lega efficientemente il fattore H e tale proprietà sembra contribuire significativamente alla protezione dal virus. A parte l'HIV, molti altri patogeni hanno sviluppato la capacità di legare il fattore H. Tra questi i batteri *Streptococcus pyogenes*, *Borrelia burgdorferi* (l'agente eziologico della malattia di Lyme), *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, i funghi patogeni *Candida albicans* e i nematodi come *Echinococcus granulosus*. Anziché il fattore H, alcuni microrganismi incorporano nei

loro involucri altre proteine regolatrici del complemento. È il caso, per esempio, dell'HIV, che durante la sua gemmazione dalla cellula infettata incorpora le proteine regolatorie DAF e CD59 attraverso un residuo di GPI.

- ***Alcuni patogeni producono specifiche proteine che mimano le funzioni delle proteine regolatorie del complemento***. *Escherichia coli* produce una proteina definita C1qBP (*C1q Binding Protein*), che inibisce la formazione del complesso tra le subunità C1q, C1r e C1s. *Staphylococcus aureus* produce invece una proteina definita SCIN (*Staphylococcal Complement INhibitor*), che si lega stabilmente e inibisce le C3 convertasi sia della via classica sia della via alternativa, inibendo di conseguenza la progressione di tutte e tre le vie di attivazione del complemento. La glicoproteina C-1 del virus herpes simplex rende instabile la convertasi della via alternativa prevenendo il legame del suo componente C3b alla properdina. Gp160, una proteina di membrana di *Trypanosoma cruzi* (l'agente eziologico della malattia di Chagas), lega il C3b impedendo la formazione della C3 convertasi e accelerandone la degradazione. La proteina VCP-1 (*Vaccinia virus Complement inhibitory Protein-1*) assomiglia dal punto di vista strutturale alla proteina C4bp umana, ma può legarsi sia al C4b sia al C3b, accelerando la degradazione delle C3 e C5 convertasi.
- ***Alcuni prodotti genici dei microrganismi possono inibire il processo infiammatorio scatenato dalle proteine del complemento***. *Staphylococcus aureus* sintetizza una proteina definita CHIPS (*CHemokine Inhibitory Protein of Staphylococci*), che agisce da antagonista dell'anafilotossina C5a.

Gli esempi sopra riportati mostrano come i microrganismi abbiano acquisito la capacità di eludere il sistema del complemento, presumibilmente a vantaggio della loro patogenicità.

IMMUNITÀ NEONATALE

Nei mammiferi, i neonati sono protetti dalle infezioni grazie agli anticorpi prodotti dalla madre e trasportati nel circolo fetale attraverso la placenta o ingeriti con il latte materno e assorbiti dall'epitelio intestinale attraverso un

processo specializzato detto transcitosi. I neonati non sono in grado di attivare risposte immunitarie efficaci contro i microrganismi e per molti mesi dopo la nascita la loro principale difesa contro le infezioni è rappresentata dall'immunità passiva fornita dagli anticorpi materni. Le IgG presenti nel sangue materno vengono trasportate attraverso la placenta, mentre le IgA e le IgG presenti nel latte materno vengono ingerite durante l'allattamento. Il trasporto transepiteliale delle IgA materne nel latte dipende dal recettore polivalente per le Ig, descritto nel Capitolo 14. Una volta raggiunto l'intestino, le IgA e le IgG sono in grado di neutralizzare i microrganismi patogeni che tentano di colonizzare quest'organo. Da qui, gli anticorpi possono anche essere trasferiti attraverso l'epitelio intestinale al circolo del lattante, che viene così ad assumere lo stesso repertorio anticorpale della madre.

Il trasporto delle IgG materne attraverso la placenta e l'epitelio intestinale del neonato è mediato da un recettore specifico per la porzione Fc delle IgG denominato **recettore neonatale per Fc** (FcRn). Tra i vari recettori Fc, FcRn è l'unico che assomiglia a una molecola MHC di classe I, essendo costituito da una catena pesante transmembrana associata non covalentemente alla β_2-microglobulina. Nonostante queste analogie strutturali, l'interazione dell'IgG con FcRn non coinvolge la tasca per il peptide, che è invece utilizzata dalle molecole MHC di classe I per presentare l'antigene al linfocita T.

Nell'adulto, FcRn è espresso dall'endotelio, dai macrofagi e da molti altri tipi cellulari. Questo recettore mantiene la funzione di proteggere dal catabolismo le IgG plasmatiche. Questo processo è stato descritto nel Capitolo 5.

RIEPILOGO

* L'immunità umorale mediata dagli anticorpi rappresenta il braccio effettore delle difese immunitarie specifiche contro i microrganismi extracellulari e contro le tossine microbiche. Gli anticorpi responsabili della protezione contro le infezioni possono essere secreti da cellule a lunga sopravvivenza (generate in seguito a una prima esposizione all'antigene) o da linfociti B della memoria (in seguito alla loro riattivazione da parte dell'antigene).
* Gli anticorpi bloccano (neutralizzano) l'infettività dei microrganismi legandosi a essi e competendo stericamente per l'interazione con i loro recettori presenti sulle cellule bersaglio. Analogamente, gli anticorpi bloccano gli effetti patologici delle tossine prevenendo il loro legame alle cellule dell'ospite.
* Gli antigeni rivestiti da anticorpi (opsonizzati) vengono fagocitati attraverso l'interazione della porzione Fc degli anticorpi con gli FcR dei fagociti. Esistono molti tipi di FcR, ognuno specifico per una delle diverse classi e sottoclassi di Ig. I diversi FcR legano le Ig con

differente affinità. L'interazione delle Ig con gli FcR trasduce segnali che stimolano l'attività microbicida dei fagociti.

* Il sistema del complemento è composto da numerose proteine solubili e di membrana che interagiscono in maniera strettamente coordinata per generare prodotti proteici dotati di diverse attività biologiche. Le tre principali vie di attivazione del complemento sono la via alternativa (che si innesca in presenza di una superficie microbica, anche in assenza di anticorpi), la via classica (attivata dagli immunocomplessi) e la via lectinica (innescata dal legame delle lectine circolanti con i carboidrati presenti sui patogeni) Queste vie generano complessi enzimatici che, tagliando la componente C3, producono frammenti che si legano covalentemente alla superficie microbica o agli anticorpi legati all'antigene, così da permettere l'attivazione del complemento limitatamente ai siti in cui questi frammenti sono immobilizzati. Tutte le vie di attivazione del complemento convergono su una via comune che consiste nella formazione di pori nella membrana del microrganismo in seguito al taglio della componente C5.
* L'attivazione del complemento è rigidamente controllata da varie proteine solubili e di membrana che inibiscono tappe diverse della cascata.
* Le funzioni biologiche del sistema del complemento comprendono: l'opsonizzazione dei microrganismi e degli immunocomplessi da parte dei frammenti proteolitici della componente C3, seguita dal loro legame ai recettori per il complemento espressi dai fagociti e infine dalla loro eliminazione; l'attivazione delle cellule infiammatorie da parte di alcuni frammenti del complemento chiamati anafilotossine (C3a, C4a, C5a); la citolisi mediata dalla formazione del MAC sulla superficie cellulare; la solubilizzazione e l'eliminazione degli immunocomplessi; il potenziamento delle altre risposte immunitarie.
* La protezione immunologica del neonato è una forma di immunità passiva fornita dagli anticorpi materni trasportati attraverso la placenta o ingeriti con il latte materno e trasportati attraverso l'epitelio intestinale del neonato grazie a un FcR specifico.

LETTURE CONSIGLIATE

Complemento

Gros P.; Milder F.J.; Janssen B.J: Complement driven by conformational changes. *Nature Reviews Immunology* 8:48–58 (2008).

Holers V.M: Complement and its receptors: new insights into human disease. *Annual Review of Immunology* 32:433–459 (2014).

Manderson A.P.; Botto M.; Walport M.J: The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Annual Review of Immunology* 22:431–456 (2004).

Ricklin D.; Lambris J.D: Complement in immune and inflammatory disorders. *Journal of Immunology* 190:3831–3838 (2013).

Roozendaal R.; Carroll M.C: Emerging patterns in complement-mediated pathogen recognition. *Cell* 125:29–32 (2006).

Funzioni effettrici degli anticorpi e recettori per Fc

Nimmerjahn F.; Ravetch J.V: Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology* 8:34–47 (2008).

Schwab I.; Nimmerjahn F: Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nature Reviews Immunology* 13:176–189 (2013).

Smith K.G.; Clatworthy M.R: FcγRIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nature Reviews Immunology* 10:328–343 (2010).

CAPITOLO 14

Immunità distrettuale: risposte immunitarie specializzate nei tessuti epiteliali e nei tessuti immunologicamente privilegiati

CARATTERISTICHE GENERALI DELLE RISPOSTE IMMUNITARIE DELLE BARRIERE EPITELIALI

SISTEMA IMMUNITARIO NEL TRATTO GASTROINTESTINALE

Immunità innata nel tratto gastrointestinale

Immunità adattativa nel tratto gastrointestinale

Controllo dell’immunità nel tratto gastrointestinale da parte dei linfociti T regolatori e delle citochine

Tolleranza orale e vaccini orali

Ruolo del microbioma commensale nella regolazione del sistema immunitario

Malattie correlate alle risposte immunitarie nell’intestino

RISPOSTA IMMUNITARIA IN ALTRI DISTRETTI MUCOSALI

Immunità nel sistema respiratorio

Immunità nel sistema genitourinario

SISTEMA IMMUNITARIO CUTANEO

Risposte immunitarie innate e adattative nella cute

Malattie correlate alle risposte immunitarie nella cute

TESSUTI IMMUNOLOGICAMENTE PRIVILEGIATI

Privilegio immunologico dell'occhio, del cervello e del testicolo

Privilegio immunologico del feto nei mammiferi

RIEPILOGO

La trattazione dell'immunità innata e adattativa si è finora incentrata sulle caratteristiche e i meccanismi delle risposte comuni a ogni distretto anatomico. Nel corso dell'evoluzione, tuttavia, il sistema immunitario ha sviluppato nei diversi distretti dell'organismo proprietà peculiari, in particolare in corrispondenza delle superfici epiteliali. Tali caratteristiche sono indispensabili per lo sviluppo di una risposta protettiva nei confronti dei diversi tipi di microrganismi presenti in questi distretti e possono inoltre garantire la tolleranza verso gli organismi commensali non patogeni che colonizzano le superfici epiteliali e il lume degli organi rivestiti da mucosa (Tab. 14-1). L'insieme dei componenti del sistema immunitario che svolge funzioni specializzate in un particolare distretto anatomico è definito sistema immunitario locale o distrettuale. La maggior parte di questo capitolo è dedicata alla discussione di questi sistemi altamente specializzati. Infine, prenderemo in considerazione quei tessuti che, normalmente, non sono coinvolti in risposte immunitarie e che vengono definiti tessuti immunologicamente privilegiati.

TABELLA 14-1 Caratteristiche dell'immunità distrettuale

Distretto	Caratteristiche specifiche	Strutture anatomiche specifiche	Cellule o molecole specializzate: funzioni
Tratto gastrointestinale	Tolleranza agli antigeni alimentari	Tonsille Placche di Peyer,	Cellule epiteliali intestinali: secrezione di muco

	Tolleranza ai microbi commensali ma responsività ai patogeni rari Enorme superficie esposta	follicoli della lamina propria	Cellule M: cattura di antigeni dal lume Cellule di Paneth: produzione di defensine IgA e IgM secretorie: neutralizzazione dei microbi nel lume Sottopopolazioni di DC: cattura di antigeni dal lume; cattura di antigeni dalla lamina propria; induzione della tolleranza cellulare; attivazione di linfociti T effettori; induzione dello scambio isotipico verso le IgA da parte delle cellule B; imprinting del fenotipo di homing all’intestino di cellule dei linfociti B e T
Sistema respiratorio	Esposizione a molteplici patogeni, germi innocui e particelle presenti nell’aria	Tonsille Adenoidi	Cellule dell’epitelio respiratorio ciliato: produzione di muco e defensine ed espulsione delle vie aeree di muco contenente microbi e particelle Secrezione di IgA, IgM, IgG: neutralizzazione dei microbi fuori dalla barriera epiteliale

Sistema immunitario cutaneo	Ampia superficie	Barriera di epitelio squamoso stratificato cheratinizzato	Cheratinociti: produzione di cheratina, secrezione di citochine e defensine Cellule di Langerhans: cattura degli antigeni epidermici Sottopopolazioni di DC: cattura di antigeni nel derma; induzione della tolleranza T; attivazione cellule dei linfociti T effettori; imprinting del fenotipo di homing nella cute

CARATTERISTICHE GENERALI DELLE RISPOSTE IMMUNITARIE DELLE BARRIERE EPITELIALI

Il sistema immunitario distrettuale comprende il sistema immunitario associato alle mucose, che è deputato a proteggere le barriere mucose gastrointestinale, broncopolmonare e genitourinaria, e il sistema immunitario cutaneo. Il sistema immunitario gastrointestinale è quello che presenta la maggiore complessità. Considerando solo il numero di linfociti localizzati nel tessuto e la quantità di anticorpi prodotta in quella sede, il sistema gastrointestinale riassume in sé tutte le componenti del braccio umorale e cellulare del sistema immunitario. Nell'uomo si stima che la mucosa intestinale contenga approssimativamente 50×10^9 linfociti (Tab. 14-2). Il reclutamento di tante risorse a livello intestinale riflette l'estensione della superficie della mucosa intestinale, che si è evoluta per ottimizzare la sua funzione primaria di assorbimento, ma che deve nel contempo fronteggiare l'invasione di migliaia di miliardi di batteri nel suo

lume. Allo stesso modo, la cute rappresenta una barriera tissutale con una vasta superficie che deve essere protetta dai microrganismi ambientali che hanno facile accesso al rivestimento esterno. Il numero totale di linfociti nella cute è stimato in circa 20×10^9, circa il doppio del numero totale dei linfociti circolanti (vedi Tab. 14-2). Le diverse caratteristiche fisiche della mucosa (morbida, umida e calda) e della cute (resistente, asciutta e fresca) favoriscono la colonizzazione e l'invasione da parte di tipi diversi di microrganismi. Pertanto, non sorprende il fatto che il sistema immunitario si sia specializzato in modo diverso in questi due tipi di tessuto.

TABELLA 14-2 Numero di linfociti presenti nei diversi tessuti

Milza	70×10^9
Linfonodi	190×10^9
Midollo osseo	50×10^9
Sangue	10×10^9
Cute	20×10^9
Intestino	50×10^9
Fegato	10×10^9
Polmone	30×10^9

I principali sistemi immunitari regionali condividono un'organizzazione anatomica di base, costituita da una barriera epiteliale esterna che svolge funzioni essenziali per prevenire l'invasione microbica, da un sottostante strato di tessuto connettivo, che contiene cellule di vario tipo distribuite in modo capillare e che sono responsabili delle risposte immunitarie innate e adattative nei confronti di microrganismi commensali o patogeni che attraversano l'epitelio, e infine da linfonodi drenanti, più distanti, in cui si attiva e viene amplificata la risposta immunitaria adattativa nei confronti dei microrganismi che hanno invaso il tessuto. La barriera epiteliale può essere costituita da più strati di diverso spessore, come accade nella cute, oppure da un singolo strato disteso su una membrana basale, come si verifica nell'intestino. Il tessuto connettivo sottostante, come il derma nella cute o la lamina propria nell'intestino, contiene numerosi linfociti, cellule dendritiche (*Dendritic Cells*, DC), macrofagi e

mastociti che costituiscono il braccio effettore delle risposte innate e adattative. Le mucose presentano inoltre tessuti linfoidi secondari organizzati, ma non incapsulati, immediatamente al di sotto della barriera epiteliale, che contengono linfociti B e T, DC e macrofagi. Questi agglomerati di cellule del sistema immunitario, spesso definiti **tessuto linfoide associato alla mucosa** (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*, **MALT**), rappresentano i siti dove vengono avviate risposte immunitarie di tipo adattativo specializzate per quel particolare tessuto mucoso. Le risposte immunitarie adattative nei sistemi immunitari regionali sono presenti anche nei linfonodi drenanti localizzati al di fuori dei tessuti barriera. Nella cute e nelle mucose, gli antigeni che si trovano al di fuori della barriera epiteliale vengono catturati da cellule specializzate presenti nell'epitelio e vengono successivamente presentati nei linfonodi drenanti o nel MALT.

Ciascun sistema immunitario distrettuale contiene tipi cellulari specializzati e particolari tipi di molecole. I leucociti caratteristici di uno o più sistemi immunitari regionali, ma che non sono presenti nel resto del sistema immunitario, comprendono specifiche popolazioni di DC (per esempio le cellule di Langerhans nella cute), cellule che trasportano l'antigene (per esempio le cellule M nell'intestino), classi di linfociti T (per esempio le cellule T γδ negli epiteli) e di linfociti B (per esempio i linfociti B e le plasmacellule che producono le IgA nelle mucose), e svariate cellule linfoidi innate. Le caratteristiche anatomiche e la presenza di tipi cellulari unici di questi tessuti conferiscono specifiche caratteristiche funzionali. Per esempio, la cattura di antigeni nell'intestino e il loro trasporto nei tessuti linfoidi secondari è a carico di tipi cellulari e vie di drenaggio linfatico che differiscono da quelli che regolano lo stesso processo nella cute o negli organi interni. Inoltre, le strutture MALT presentano caratteristiche differenti in diverse regioni dell'intestino e negli altri organi mucosali.

I linfociti effettori che si generano nei linfonodi drenanti o nel MALT di un particolare sistema immunitario distrettuale (per esempio cute e intestino tenue) entreranno nel circolo ematico per ricomparire poi nel tessuto connettivo sottoepiteliale dello stesso organo (per esempio derma e lamina propria). La migrazione e la localizzazione di classi di linfociti in specifici tessuti sono in parte dovute ai meccanismi di homing tessuto-

specifico che dirigono queste cellule dal circolo ematico verso particolari tessuti; questo argomento sarà trattato in dettaglio più avanti in questo capitolo.

I sistemi immunitari regionali hanno importanti funzioni di regolazione il cui scopo è prevenire le reazioni indesiderate nei confronti di microrganismi non patogeni e di sostanze estranee che possono essere presenti in corrispondenza delle diverse barriere. L'esempio tipico è rappresentato dal sistema immunitario associato all'intestino, che ha il compito di inibire le risposte verso batteri commensali che colonizzano la mucosa intestinale, nonché verso le sostanze alimentari, ma esso deve essere nello stesso tempo in grado di riconoscere e innescare una risposta nei confronti di batteri patogeni quando presenti. La soppressione delle risposte immunitarie nei confronti degli organismi non patogeni e di sostanze estranee innocue è importante anche in altri distretti dell'organismo, come la cute, il polmone e il tratto genitourinario, che non sono sterili e sono costantemente esposti all'ambiente circostante.

A questo punto saranno discusse in dettaglio le caratteristiche peculiari dei differenti sistemi immunitari regionali, a partire da quello più rappresentato.

SISTEMA IMMUNITARIO NEL TRATTO GASTROINTESTINALE

Il tratto gastrointestinale è costituito da un cavo tubiforme rivestito da uno strato continuo di cellule epiteliali, come gli altri tessuti mucosi, adagiato su una membrana basale che funge da barriera fisica verso l'esterno. Al di sotto dell'epitelio, è presente uno strato di tessuto connettivo lasso, chiamato lamina propria dell'intestino, che contiene vasi sanguigni, vasi linfatici e MALT (Fig. 14-1). La sottomucosa è costituita da uno strato di tessuto connettivo denso che ha la funzione di connettere la mucosa con gli strati di muscolatura liscia.

FIGURA 14-1 Il sistema immunitario gastrointestinale. A. Rappresentazione schematica delle componenti cellulari del sistema

immunitario della mucosa intestinale. **B.** Microfotografia del MALT dell'intestino umano. Aggregati di tessuto linfoide simili a questo sono presenti in tutta la superficie del tratto gastrointestinale.

Dal punto di vista immunologico, il tratto gastrointestinale presenta due importanti caratteristiche. In primo luogo, nel loro insieme la mucosa dell'intestino tenue e dell'intestino crasso raggiungono una superficie complessiva di oltre 200 m^2 (le dimensioni di un campo da tennis), costituita soprattutto da piccoli villi intestinali e microvilli. In secondo luogo, il lume dell'intestino è colmo di microrganismi, molti dei quali sono ingeriti insieme al cibo, e la maggior parte di essi è in continua crescita come commensali sulla superficie della mucosa dei soggetti sani. Si stima che più di 500 differenti specie di batteri siano presenti nell'intestino dei mammiferi, pari a circa 10^{14} cellule. Tali numeri, 10 volte superiori a tutte le cellule dell'intero organismo, hanno indotto alcuni microbiologi a far notare che noi esseri umani siamo in realtà umani solo per il 10% e per il restante 90% siamo costituiti da batteri! L'evoluzione ci ha portato a dipendere da questi commensali per diverse funzioni, tra le quali vi è anche la degradazione di alcuni componenti della dieta che le nostre cellule non sarebbero in grado di digerire. Questi commensali competono anche con microrganismi potenzialmente patogeni presenti nell'intestino e prevengono l'instaurarsi di infezioni dannose per l'organismo. Gli organismi commensali sono utili quando sono confinati sul lato esterno della barriera della mucosa intestinale, ma possono risultare potenzialmente letali quando superano la barriera mucosa ed entrano in circolo o attraversano la parete intestinale, soprattutto negli individui immunocompromessi. Inoltre, esiste il rischio che gli organismi patogeni non commensali possano entrare a far parte della variegata miscela di microrganismi che compongono la flora intestinale, se ingeriti insieme a cibo o acqua contaminati. Tali organismi patogeni comprendono batteri, virus, protozoi e parassiti, come gli elminti, che possono essere causa di gravi patologie, talvolta senza invadere il rivestimento epiteliale e pur rappresentando solo una piccola frazione dei microrganismi presenti nel lume intestinale. Per mantenere lo stato di salute, il sistema immunitario associato alle mucose deve essere in grado di riconoscere ed eliminare questi agenti patogeni scarsamente rappresentati all'interno dell'enorme numero di microrganismi non patogeni.

Nel corso dell'evoluzione si sono sviluppati numerosi meccanismi di riconoscimento e meccanismi effettori dell'immunità innata e adattativa, che saranno discussi nel corso del capitolo, alcuni dei quali sono ben conosciuti, altri invece non ancora pienamente caratterizzati. Molte caratteristiche del sistema immunitario gastrointestinale sono condivise con altri tessuti mucosi e per questo sarà dato particolare rilievo alle caratteristiche comuni dell'immunità mucosale. Purtroppo le infezioni intestinali da organismi patogeni spesso non sono controllate dall'immunità mucosale e rappresentano la causa di milioni di morti ogni anno in tutto il mondo.

Immunità innata nel tratto gastrointestinale

Le cellule epiteliali intestinali che rivestono l'intestino tenue e l'intestino crasso sono parte integrante del sistema dell'immunità innata gastrointestinale, che è coinvolto nelle risposte contro gli agenti patogeni, nella tolleranza verso i microorganismi commensali e nella cattura di antigeni che poi vengono presentati al sistema dell'immunità adattativa intestinale. Esistono diversi tipi di cellule epiteliali intestinali e tutte derivano da un comune precursore presente nelle cripte delle ghiandole intestinali. Tra queste ricordiamo le cellule caliciformi secernenti il muco, che sono localizzate nella parte più alta dei villi intestinali; le cellule epiteliali che svolgono funzioni di assorbimento, che secernono citochine; le cellule M, specializzate nella cattura dell'antigene, che si trovano in strutture a cupola altamente specializzate e rivestono i tessuti linfoidi; infine, le cellule di Paneth, che secernono peptidi antibatterici e sono localizzate in fondo alle cripte. Come vedremo più avanti, tutti questi tipi cellulari contribuiscono in misura differente alla funzione di barriera della mucosa.

La protezione dell'immunità innata nell'intestino è dovuta in parte alla barriera di natura fisico-chimica, costituita dalle cellule epiteliali della mucosa e dalla secrezione di muco. Le cellule epiteliali intestinali adiacenti sono caratterizzate da proteine che formano giunzioni strette, tra cui la ZO-1 (*Zonula Occludens 1)* e le claudine, le quali bloccano il movimento dei microbi tra le cellule nella lamina propria. Inoltre, le cellule epiteliali della mucosa producono sostanze antimicrobiche, come le defensine (vedi Cap.

4). Diversi tipi di cellule presenti nella mucosa, tra cui le cellule epiteliali, le DC e i macrofagi, sono in grado di attivare risposte infiammatorie e antivirali. La maggior parte di queste risposte è causata dall'attivazione dei PRR da parte della componente microbica, come già visto nel Capitolo 4. È interessante notare come alcuni recettori dell'immunità innata che promuovono le risposte infiammatorie in altre parti del corpo abbiano, invece, un'azione antinfiammatoria nell'intestino. In questo paragrafo, descriveremo le caratteristiche dell'immunità innata specifiche dell'intestino.

Diverse proteine ampiamente glicosilate, chiamate mucine, formano una barriera fisica vischiosa che impedisce il contatto dei microrganismi con le cellule del tratto gastrointestinale. Le mucine contengono numerosi residui O-oligosaccaridici e comprendono glicoproteine secrete o localizzate sulla superficie cellulare. Le mucine secrete, tra cui MUC2, MUC5 e MUC6, formano un gel idratato dello spessore di 300-700 μm che presenta due strati: uno esterno meno denso, normalmente colonizzato da batteri, e uno interno più denso fissato all'epitelio e privo di batteri. Questi strati di muco a diversa densità servono a evitare il contatto tra i microbi e le cellule epiteliali di rivestimento e fungono da matrice per esporre le sostanze antimicrobiche prodotte dalle cellule epiteliali. Alcune mucine agiscono come molecole trappola (*decoy*), che possono essere rilasciate dalle cellule epiteliali e legano le proteine adesive che i batteri patogeni utilizzano per legarsi alla membrana della cellula ospite. Oltre alla secrezione mucosa, la superficie apicale delle cellule epiteliali gastrointestinali è rivestita da mucine legate alla membrana, tra cui MUC1, MUC3A/b, MUC12, MUC13 e MUC17. Queste mucine legate alla membrana si associano a vari glicolipidi a formare un fitto strato macromolecolare sulla superficie della cellula epiteliale, chiamato glicocalice, che presenta uno spessore variabile di 30-500 nm nelle diverse porzioni dell'intestino. Il glicocalice ha la stessa funzione del muco secreto, cioè formare una barriera fisica per prevenire il contatto con i microbi.

La barriera mucosa dell'intestino presenta un rapido turnover e una diversa reattività in risposta a stimoli ambientali di diversa natura e segnali immunologici, che permettono un rapido potenziamento dell'efficienza delle funzioni di barriera. Le mucine sono prodotte in

maniera costitutiva sia dalle cellule della superficie epiteliale del tratto gastrointestinale sia dalle ghiandole della sottomucosa e vengono sostituite da molecole di nuova sintesi ogni 6-12 ore. Un aumento consistente nella produzione di mucine può essere causato da diversi stimoli ambientali e immunologici, come le citochine (interleuchina IL-1, IL-4, IL-6, IL-9, IL-13, fattore di necrosi tumorale [*Tumor Necrosis Factor*, TNF] e interferone di tipo I), prodotti dei neutrofili (come l'enzima elastasi) e proteine adesive microbiche. Oltre ad aumentare l'espressione dei geni per le mucine, questi stimoli possono anche alterare il grado di glicosilazione delle mucine modificando l'espressione degli enzimi glicosiltransferasi. Si ritiene che i cambiamenti quantitativi e qualitativi nel grado di glicosilazione delle mucine possano aumentare la funzione di barriera contro gli agenti patogeni.

Le defensine, prodotte dalle cellule dell'epitelio intestinale, forniscono protezione da parte dell'immunità innata contro i batteri presenti nel lume intestinale ed è stato osservato che un deficit della loro produzione è associato all'invasione batterica e all'instaurarsi della malattia infiammatoria intestinale. Le defensine sono peptidi prodotti da vari tipi di cellule nell'organismo, che esercitano effetti tossici letali sui microrganismi, poiché sono in grado di penetrare e determinare la perdita dell'integrità delle membrane fosfolipidiche esterne (vedi Cap. 4). Nell'intestino tenue, le defensine più rappresentate sono le α-defensine, tra cui nell'uomo, la defensina 5 (HD5) e la defensina 6 (HD6), entrambe prodotte costitutivamente in forma di precursore inattivo dalle cellule di Paneth localizzate alla base delle cripte, tra i microvilli. La forma attiva di HD5 e HD6 è generata in seguito a taglio proteolitico da parte della tripsina, anch'essa prodotta dalle cellule di Paneth. Nel colon, le β-defensine sono prodotte dalle cellule epiteliali deputate all'assorbimento, localizzate nelle cripte intestinali; la produzione costitutiva viene aumentata in risposta a IL-1 o ai batteri invasivi. Inoltre, i granuli contenuti nei neutrofili sono ricchi in α-defensine, una componente che probabilmente contribuisce alle funzioni antimicrobiche nell'ambito delle infezioni della parete intestinale. Diversi studi hanno identificato difetti di produzione delle defensine da parte delle cellule epiteliali nelle regioni dell'intestino colpite dal morbo di Crohn, una malattia infiammatoria cronica che può estendersi all'intero tratto gastrointestinale.

Le cellule di Paneth e altre cellule epiteliali dell'intestino secernono anche una lectina di tipo C chiamata REGIIIγ (*Regenerating islet-derived protein IIIγ*), che inibisce la colonizzazione batterica a livello della superficie epiteliale. REGIIIγ e il suo omologo umano REGIIIα, si legano ai peptidoglicani dei batteri Gram-positivi. L'espressione di REGIIIγ da parte delle cellule epiteliali intestinali richiede l'attivazione dei TLR in risposta a un microrganismo commensale, e la sua produzione aumenta in seguito alla colonizzazione e infezione da parte di microrganismi patogeni.

I recettori Toll-like* (Toll-Like Receptors, *TLR*) *e i recettori citoplasmatici di tipo NOD* (NOD-Like Receptors, *NLR*), *espressi dalle cellule epiteliali intestinali, promuovono una risposta immunitaria nei confronti degli agenti patogeni invasivi, ma sono anche finemente regolati in modo da poter limitare la risposta infiammatoria nei confronti dei batteri commensali. Nel Capitolo 4, i TLR e gli NLR sono stati definiti come recettori cellulari che riconoscono i PAMP prodotti dai microrganismi e generano segnali che promuovono risposte infiammatorie e antivirali da parte delle cellule. La maggior parte dei batteri presenti nel lume intestinale risulta non patogena finché resta confinata al di là della barriera epiteliale, tuttavia questi batteri possono esprimere lo stesso profilo di PAMP presente nei batteri patogeni, come il lipopolisaccaride, il peptidoglicano, il CpG DNA e la flagellina. Le risposte infiammatorie che coinvolgono le cellule epiteliali intestinali possono alterare la loro funzione di barriera permettendo l'invasione batterica e l'instaurarsi di un processo infiammatorio. Non è quindi sorprendente il fatto che nel corso dell'evoluzione si siano sviluppati rigorosi meccanismi di controllo con lo scopo di limitare le risposte infiammatorie causate dall'attivazione dei TLR in risposta ai batteri commensali. Le cellule epiteliali intestinali esprimono un'ampia gamma di TLR, quali TLR2, 4, 5, 6, 7 e 9, che sono espressi in maniera differente nelle diverse regioni dell'intestino. Il legame di alcuni TLR induce la fosforilazione e la riorganizzazione di ZO-1 e incrementa la forza di legame delle giunzioni tra le cellule epiteliali; inoltre, la trasduzione del segnale dei TLR produce un aumento della motilità e della proliferazione dell'epitelio intestinale. Tali risposte funzionali sono in grado di aumentare le funzioni di barriera senza causare infiammazione. Nell'intestino, le risposte dei TLR sembrano anche essere attraverso la regolazione dei loro livelli di espressione o dalla selettiva espressione in

determinati siti (Fig. 14-2). Per esempio, il TLR5, che riconosce le flagelline batteriche, è esclusivamente espresso a livello della superficie basocellulare dell'epitelio, in modo da risultare accessibile solo ai batteri che sono penetrati attraverso la barriera. Allo stesso modo, i recettori della famiglia NLR specifici per le flagelline (per esempio NAIP e IPAF-1) sono espressi nel citoplasma delle cellule epiteliali intestinali e sono in grado di attivare le risposte infiammatorie solo quando i batteri patogeni, o i loro prodotti, riescono ad accedere al citosol. È stato inoltre dimostrato che nelle cellule epiteliali intestinali i meccanismi di trasduzione del segnale dei TLR determinano una soglia di attivazione più elevata rispetto a quella delle cellule epiteliali e delle DC di altri tessuti, limitando l'insorgere delle risposte infiammatorie.

FIGURA 14-2 Espressione nella mucosa intestinale dei recettori che riconoscono i profili molecolari (PRR). I PRR che riconoscono la flagelliina batterica sono concentrati nel citosol (NLR) o nella membrana basale (TLR5) delle cellule epiteliali intestinali, ma non sulla membrana apicale/luminale; questa selettiva localizzazione impedisce il riconoscimento dei microbi presenti nel lume intestinale.

Negli individui sani, le DC e i macrofagi della lamina propria dell'intestino inibiscono l'infiammazione e contribuiscono al mantenimento dell'omeostasi. I macrofagi intestinali hanno un fenotipo unico che permette loro di fagocitare e uccidere i microrganismi e allo stesso tempo di secernere citochine antinfiammatorie, come l'IL-10. Questo fenotipo è apparentemente determinato dal TGF-β (*Transforming Growth Factor-β*) secreto nell'ambiente mucosale. L'espressione del TLR4 da parte dei macrofagi e delle DC della lamina propria è ridotta rispetto ad altri tessuti e la risposta trascrizionale caratteristica dell'infiammazione è spesso inibita dai prodotti microbici. Questa particolare regolazione è verosimilmente il risultato del processo evolutivo mirato alla prevenzione di potenziali danni della risposta infiammatoria nei confronti dei batteri commensali e dei batteri che hanno invaso la barriera epiteliale.

Le cellule linfoidi innate che producono IL-17 e IL-22 sono localizzate principalmente nella mucosa intestinale e contribuiscono alle difese immunitarie contro alcuni batteri nonché alla funzione di barriera

dell'epitelio mucosale. Come già descritto nei Capitoli 2 e 4, le cellule linfoidi innate non esprimono il TCR ma, sulla base delle citochine in grado di produrre, queste cellule presentano caratteristiche comuni a classi di linfociti T helper. Le cellule linfoidi innate che appartengono al gruppo 3 secernono infatti IL-17 e IL-22, analogamente alle cellule T_H17. Queste citochine migliorano la funzione di barriera della mucosa intestinale attraverso la produzione di muco e di defensine e rafforzando l'efficienza delle giunzioni epiteliali. Tali citochine favoriscono, inoltre, il trasporto delle IgA nel lume intestinale che, come vedremo più avanti in questo capitolo, costituisce una componente fondamentale dell'immunità adattativa intestinale.

Immunità adattativa nel tratto gastrointestinale

Il braccio adattativo del sistema immunitario nel tratto gastrointestinale presenta caratteristiche distinte rispetto ad altri organi.

- ***La principale forma di immunità adattativa nell'intestino è l'immunità umorale diretta verso i microrganismi presenti nel lume***, che impedisce ai batteri commensali e ai patogeni di colonizzare e invadere la barriera epiteliale della mucosa. Questa funzione è esercitata dagli anticorpi IgA dimerici che sono secreti nel lume dell'intestino o, nel caso di neonati allattati al seno materno, da IgA secrete nel colostro e nel latte materno ingerito dal bambino. Anche significative quantità di anticorpi IgG e IgM sono presenti nel lume intestinale e contribuiscono all'immunità umorale in questo distretto.

- ***La risposta cellulo-mediata protettiva che prevale in questa sede è rappresentata dalle cellule effettrici T_H17***, che rappresentano la sottopopolazione di linfociti T effettori più numerosa nella mucosa intestinale.

- ***Uno dei principali meccanismi per il controllo delle risposte immunitarie nell'intestino è l'attivazione dei linfociti T regolatori (Treg).*** Il sistema immunitario adattativo dell'intestino deve essere in grado di sopprimere continuamente la potenziale risposta verso gli antigeni alimentari e gli antigeni dei microrganismi commensali, allo

scopo di prevenire reazioni infiammatorie che potrebbero compromettere la barriera mucosa. In nessun'altro distretto del nostro organismo esiste un impegno così importante del sistema immunitario per garantire la tolleranza nei confronti degli antigeni non self. Alcune sottopopolazioni sono più abbondanti nel MALT che in altri organi linfoidi.

Discuteremo delle specifiche caratteristiche dell'immunità adattativa del tratto gastrointestinale, prendendo in considerazione l'organizzazione anatomica del tratto, la cattura dell'antigene, l'homing, il differenziamento dei linfociti e la secrezione di anticorpi nel lume intestinale.

Anatomia funzionale del sistema immunitario adattativo nel tratto gastrointestinale

In questo paragrafo saranno presi in considerazione l'organizzazione anatomica delle cellule dell'intestino e il rapporto che questa organizzazione può avere con l'attivazione, il mantenimento e la regolazione delle risposte adattative. In termini generali, l'anatomia funzionale del sistema immunitario adattativo nell'intestino si è evoluta per affrontare efficacemente la condizione, sottolineata in precedenza, in cui si contrappone la grande abbondanza di microrganismi commensali allo scarso numero di patogeni che si trovano appena al di là dell'estesa barriera costituita dalle cellule epiteliali intestinali.

Nell'intestino le risposte immunitarie adattative prendono l'avvio in strutture funzionali organizzate strettamente associate allo strato epiteliale della mucosa, formate da linfociti e cellule che presentano l'antigene, oltre che nei linfonodi mediastinici (vedi Fig. 14-1). I linfociti naïve sono esposti agli antigeni in questi siti e si differenziano in cellule effettrici. Questi tessuti linfoidi associati all'intestino, adiacenti all'epitelio della mucosa, a volte sono indicati come GALT, che è la versione gastrointestinale del MALT, anche se i termini sono spesso usati come sinonimi. Le strutture più rilevanti del GALT sono rappresentate dalle **placche di Peyer**, che si trovano principalmente nell'ileo distale, e da piccoli aggregati di follicoli linfoidi o follicoli isolati nell'appendice e nel colon. Le placche di Peyer hanno la struttura simile a quella dei follicoli linfoidi, con centri germinativi contenenti linfociti B, cellule T helper

follicolari, cellule dendritiche follicolari e macrofagi. Nei follicoli, i centri germinativi sono circondati da cellule B follicolari naïve che esprimono IgM e IgD. La regione definita “cupola” si trova tra i follicoli e l’epitelio sovrastante e contiene linfociti B e T, DC e macrofagi. Tra i follicoli vi sono aree parafollicolari ricche di linfociti T, con struttura simile a quella dei linfonodi, ma nel complesso nel GALT il rapporto tra linfociti B e T è circa 5 volte superiore a quello dei linfonodi. Inoltre, a differenza dei linfonodi, le strutture GALT non sono incapsulate e le vie attraverso le quali arrivano gli antigeni sono indipendenti dai vasi linfatici. Lo sviluppo di entrambe le strutture linfoidi specializzate, ovvero le placche di Peyer e i follicoli isolati nella lamina propria dell’intestino, richiede l’intervento di cellule linfoidi innate in grado di indurre la formazione del tessuto linfoide. Queste cellule, che fanno parte delle cellule linfoidi innate, esprimono il fattore trascrizionale RORγT e producono la citochina linfotossina-β (LTβ).

La via principale di diffusione degli antigeni dal lume intestinale al GALT è rappresentata da cellule specializzate che si trovano all’interno dell’epitelio intestinale chiamate cellule M (dall’inglese* microfold*) (Fig. 14-3). Le cellule M sono localizzate nelle regioni dell’epitelio intestinale definite zone associate ai follicoli o epitelio a cupola, che sovrastano le placche di Peyer e altre strutture del GALT. Anche se le cellule M e le più numerose cellule epiteliali con funzioni di assorbimento, probabilmente derivano da un comune precursore epiteliale, le cellule M si distinguono per la presenza nella loro membrana di un sottile glicocalice, di microvilli relativamente piccoli e irregolari (per questo sono definite *microfold*) e larghe fenestrazioni, caratteristiche che nel complesso servono ad aumentare la capacità di cattura degli antigeni dal lume intestinale. La funzione principale delle cellule M è il trasporto transcellulare di varie sostanze attraverso la barriera epiteliale, dal lume dell’intestino alle sottostanti cellule che presentano l’antigene. Le cellule M catturano, in maniera efficiente, il contenuto del lume utilizzando varie modalità, tra cui la fagocitosi, effettuata in modo simile ai macrofagi, e l’endocitosi, sia con vescicole rivestite di clatrina sia in fase fluida. Questi meccanismi permettono la cattura di batteri interi, virus e prodotti microbici solubili. A differenza dei macrofagi e delle DC, le cellule M non sono specializzate nella presentazione delle sostanze catturate, piuttosto esse trasportano le particelle e le molecole presenti all’interno delle vescicole endocitiche

attraverso il citosol per rilasciarle, per esocitosi, a livello della membrana basocellulare, nelle regioni a cupola delle placche di Peyer e dei follicoli linfoidi della lamina sottostanti dove si trovano le DC. Sebbene queste cellule svolgano un ruolo cruciale nella protezione verso i microbi presenti nel lume, alcuni microrganismi si sono evoluti per sfruttare le cellule M come via di invasione attraverso la barriera mucosa. L'esempio meglio conosciuto è rappresentato da *Salmonella typhimurium*, molto simile al ceppo patogeno nell'uomo, *Salmonella typhi*, che causa la febbre tifoide. Le cellule M esprimono lectine che permettono a questi batteri di legarsi in modo specifico e essere internalizzati. I batteri, essendo citotossici per le cellule M, provocano la formazione di lacune nell'epitelio che facilitano l'invasione di altri microrganismi. Le lectine delle cellule M possono inoltre promuovere infezioni da parte di alcuni ceppi di virus enteropatici.

FIGURA 14-3 Cellule M nell'intestino tenue. Le cellule M sono cellule dell'epitelio intestinale altamente specializzate che si trovano nell'epitelio dell'intestino tenue, al di sopra delle placche di Peyer e dei follicoli linfoidi della lamina propria (**A**). A differenza delle cellule epiteliali limitrofe, caratterizzati da alti bordi micro villosi e dotate principalmente di funzioni di assorbimento, le cellule M presentano villi più corti (**B**) e si occupano del trasporto di microbi o di molecole intatte attraverso la barriera della mucosa dei tessuti linfoidi associati alla mucosa, dove vengono passate alle DC (**C**). (***B,*** *Da Corr SC, Gahan CC, Hill C: M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis, FEMS Immunology and Medical Microbiology 52:2-12, 2008.*)

Gli antigeni microbici presenti nel lume intestinale possono anche essere catturati dalle DC della lamina propria, che estendono le loro estroflessioni citoplasmatiche tra le cellule dell'epitelio intestinale (Fig. 14-4). Le DC in grado di catturare gli antigeni sono particolarmente numerose in alcune regioni dell'intestino, specialmente nell'ileo terminale, dove estroflettono i loro dendriti tra le giunzioni che connettono cellule epiteliali adiacenti, apparentemente senza recare alcun danno a queste giunzioni. Le DC che catturano gli antigeni possono promuovere risposte immunitarie adattative nei confronti di patogeni presenti nel lume intestinale. Diversamente dalle cellule M, le DC sono in grado di

processare e presentare gli antigeni proteici ai linfociti T presenti nel GALT. Anche le DC residenti nella lamina propria catturano gli antigeni che sono riusciti a penetrare fra le giunzioni delle cellule epiteliali.

FIGURA 14-4 Campionamento degli antigeni intestinali da parte delle cellule dendritiche. Le cellule dendritiche sono presenti nella mucosa intestinale e catturano gli antigeni che verranno presentati ai linfociti T nel GALT e nei linfonodi mesenterici. **A.** Alcune cellule dendritiche estendono i loro processi dendritici tra le cellule dell'epitelio intestinale per campionare gli antigeni presenti nel lume. Anche i macrofagi possono svolgere questa funzione. **B.** Altre cellule dendritiche presenti nella lamina propria catturano gli antigeni derivati dal contenuto luminale e che hanno attraversato la barriera epiteliale.

Gli antigeni vengono trasportati tramite la linfa dall'intestino tenue e dall'intestino crasso ai linfonodi e qui inducono il differenziamento dei linfociti T effettori e T regolatori che poi ritornano alla lamina propria. Vi sono da 100 a 150 linfonodi situati tra gli strati membranosi del mesentere. I linfonodi mesenterici condividono con il GALT alcune funzioni, come il differenziamento dei linfociti B in plasmacellule che secernono IgA e lo sviluppo dei linfociti T effettori e regolatori. Le cellule che si differenziano nei linfonodi mesenterici in risposta all'invasione della parete intestinale da parte dei microrganismi patogeni o commensali vengono indirizzati alla lamina propria (vedi più avanti).

Le risposte immunitarie nei confronti dei microbi della cavità orale originano a livello delle tonsille linguali e palatine. Queste sono strutture linfoidi non capsulate poste rispettivamente alla base della lingua e dell'orofaringe, al di sotto della mucosa composta da epitelio squamoso stratificato. Queste tonsille, insieme alle tonsille nasofaringee, formano un anello di tessuti linfoidi chiamati anello di Waldeyer. La maggior parte del tessuto linfoide tonsillare è composto da follicoli linfoidi che di solito hanno importanti centri germinativi. L'epitelio squamoso superficiale presenta molteplici invaginazioni strette e profonde, definite cripte, che si sviluppano nel tessuto follicolare. Anche se queste tonsille sono considerate parte del GALT, esse si distinguono per il fatto di essere separate dalla cavità orale, ricca di microbi, mediante multipli strati di cellule epiteliali

squamose piuttosto che da un singolo strato di cellule epiteliali come avviene nell'intestino. Il meccanismo di cattura degli antigeni dei microrganismi della cavità orale non è ancora ben conosciuto; le cripte rappresentano i siti più probabili di cattura. Le tonsille linguali e palatine rispondono tuttavia alle infezioni della mucosa epiteliale mediante un significativo ingrossamento e una vigorosa risposta anticorpale costituita prevalentemente dalle IgA. Le infezioni tipiche che si associano alla tumefazione delle tonsille, soprattutto nei bambini, sono causate dagli streptococchi e dal virus di Epstein-Barr.

I linfociti effettori che si generano nel GALT e nei linfonodi mesenterici sono caratterizzati da proprietà di homing nell'intestino che dipendono dalla selettiva espressione di integrine e recettori per le chemochine, che ne permettono il ricircolo dal sangue alla lamina propria (Fig. 14-5). Le funzioni del sistema immunitario gastrointestinale dipendono dall'elevato numero di linfociti T e di cellule che producono anticorpi che hanno la proprietà di accasarsi nella lamina propria e di rispondere in tempi molto rapidi agli agenti patogeni. Sia i linfociti T effettori sia i linfociti B che secernono le IgA acquisiscono il peculiare fenotipo di homing intestinale in seguito a "istruzioni" impartite durante l'attivazione nel GALT o nei linfonodi drenanti che modificano l'espressione delle molecole di adesione e dei recettori per le chemochine. L'integrina maggiormente espressa dai linfociti B e T che si accasano nell'intestino è $\alpha_4\beta_7$, una proteina che lega MadCAM-1 espressa dalle cellule endoteliali delle venule postcapillari della lamina propria. L'homing nell'intestino richiede anche l'espressione del recettore per le chemochine CCR9 da parte dei linfociti B e T e la presenza del suo ligando, la chemochina CCL25, che è prodotta dalle cellule epiteliali intestinali. L'espressione combinata di MadCAM-1 e CCL25 è ristretta all'intestino. L'homing al colon di cellule che producono le IgA richiede l'espressione di CCR10 e della chemochina CCL28, ma questa via non è specifica dell'intestino, in quanto CCL28 è espressa anche dalle cellule epiteliali di altre mucose, come l'apparato respiratorio e il tratto genitourinario. Anticorpi monoclonali che bloccano in maniera specifica la catena α_4 dell'integrina $\alpha_4\beta_7$ sono stati utilizzati nei pazienti affetti da malattie croniche dell'intestino proprio basandosi sulle conoscenze acquisite, relative al fatto che i linfociti T effettori necessitano

di questa integrina per penetrare nei tessuti intestinali (più avanti nel presente capitolo si discuterà delle malattie infiammatorie dell'intestino).

FIGURA 14-5 Caratteristiche dell'homing dei linfociti intestinali. La capacità dei linfociti effettori di dirigersi specificamente nell'intestino sono acquisite nei tessuti linfoidi, dove i linfociti vanno incontro al differenziamento a partire da precursori naïve. Le DC dei tessuti linfoidi associati alla mucosa, tra cui le placche di Peyer e i linfonodi mesenterici, sono attivate dalla linfopoietina timica stromale (TSLP) e da altri fattori, ed esprimono l'enzima RALDH, che converte la vitamina A introdotta con la dieta in acido retinoico. I linfociti B e T naïve che riconoscono gli antigeni nel GALT cominciano a esprimere il recettore CCR9 e l'integrina $\alpha_4\beta_7$ in risposta all'esposizione all'acido retinoico. I linfociti effettori entrano in circolo e tornano nella lamina propria dell'intestino in risposta alla chemochina CCL25 (il ligando di CCR9) e alla molecola di adesione MadCAM (il ligando per $\alpha_4\beta_7$) espresse dalle cellule endoteliali delle venule della lamina propria.

Il fenotipo di homing intestinale dei linfociti B che producono IgA e dei linfociti T effettori è impresso dalle DC attraverso l'azione dell'acido retinoico durante il processo di attivazione (vedi Fig. 14-5). Oltre a promuovere il differenziamento dei linfociti T in cellule effettrici e dei linfociti B naïve in cellule che secernono IgA, di cui si parlerà più avanti, le DC del GALT e dei linfonodi mesenterici producono segnali che promuovono l'espressione dell'integrina $\alpha_4\beta_7$ e di CCR9 sulle cellule effettrici. L'espressione di queste molecole dipende dalla secrezione di acido retinoico, sebbene i meccanismi non siano ancora ben conosciuti. L'induzione selettiva di cellule che fanno homing nell'intestino è spiegata dal fatto che i tessuti linfoidi intestinali sono esposti alla vitamina A introdotta con la dieta e le DC del GALT, a differenza di quelle di altri tessuti, esprimono una deidrogenasi (*Retinal Dehydrogenase*, RALDH) necessaria per la sintesi di acido retinoico dalla vitamina A. Oltre che alle DC dei linfonodi mesenterici, anche le cellule dell'epitelio intestinale esprimono l'enzima RALDH e possono sintetizzare l'acido retinoico. In base a queste proprietà del sistema immunitario dell'intestino, è noto che la vaccinazione per via orale, a differenza di quella per via intradermica, non

solo ha il vantaggio di favorire l'espansione dei linfociti B che producono IgA, ma anche l'aumento di espressione di $\alpha_4\beta_7$.

La lamina propria contiene linfociti effettori, DC e macrofagi diffusamente distribuiti e rappresenta il sito della fase effettrice delle risposte adattative gastrointestinali. Come già precedentemente detto, i linfociti effettori generati nelle placche di Peyer, oltre che nelle strutture GALT e nei linfonodi mesenterici, hanno la capacità di ritornare nella lamina propria. In questa sede, i linfociti T rispondono ai patogeni e i linfociti B possono secernere anticorpi che vengono trasportati nel lume per neutralizzare i patogeni prima che questi invadano la barriera epiteliale.

Immunità umorale nel tratto gastrointestinale

Nel tratto gastrointestinale, la principale funzione dell'immunità umorale è la neutralizzazione dei microbi luminali, che è principalmente dovuta all'azione delle IgA prodotte nel GALT e trasportate nel lume attraverso l'epitelio mucosale. Anche le IgG e le IgM, sebbene in livelli più bassi ma significativi, vengono secreti anche nel lume intestinale dove insieme alle IgA legano e neutralizzano i microbi e le tossine prevenendo il loro legame alle cellule dell'ospite. Questa forma di immunità umorale è talvolta definita immunità secretoria e si è evoluta in modo particolare nei mammiferi. La risposta anticorpale agli antigeni introdotti mediante ingestione è tipicamente dominata dalle IgA e l'immunità secretoria rappresenta il meccanismo attraverso il quale i vaccini orali, come quello contro la poliomelite, esplicano il loro effetto protettivo. Diverse proprietà del microambiente intestinale risultano peculiari nello sviluppo selettivo delle cellule che secernono le IgA che sono localizzate nel tratto gastrointestinale o che, una volta entrate in circolo, ritornano nella lamina propria dell'intestino. Ne consegue che le cellule che secernono le IgA si accumulano attivamente in prossimità dell'epitelio, che sarà poi in grado di captare le IgA secrete e trasportarle nel lume.

Le IgA costituiscono l'isotipo anticorpale più rappresentato nel tratto gastrointestinale. Si stima che un individuo normale di 70 kg sia in grado di secernere circa 2 g di IgA al giorno, quantità che rappresenta circa il 60-70% della totale produzione di anticorpi. Questa enorme produzione di IgA

è giustificata dall'elevato numero di plasmacellule secernenti IgA presenti nel GALT, che si stima rappresentino l'80% di tutte le plasmacellule nell'organismo (Fig. 14-6). Poichè la sintesi delle IgA avviene prevalentemente nel MALT e il loro trasporto nel lume è particolarmente efficiente, le IgA costituiscono meno di un quarto del totale degli anticorpi circolanti e rappresentano un componente minore dell'immunità umorale sistemica.

FIGURA 14-6 Plasmacellule che producono le IgA nell'intestino. L'immagine in immunofluorescenza mostra l'abbondanza di plasmacellule secernenti IgA (*in verde*) nella mucosa del colon in confronto alle plasmacellule che secernono le IgG (*in rosso*). Le IgA secrete possono essere evidenziate come citoplasma verde nelle cellule epiteliali delle cripte. (*Da Brandtzaeg P. The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. The Journal of Pediatrics 156 [Suppl 1]:S8-S16, 2010.*)

La prevalenza nella produzione di IgA da parte delle plasmacellule intestinali è dovuta in parte allo scambio isotipico verso le IgA che avviene nel GALT e nei linfonodi mesenterici. Lo scambio isotipico verso le IgA nell'intestino può avvenire con meccanismi T-dipendenti e meccanismi T-indipendenti (Fig. 14-7). In entrambi i casi, le molecole che guidano lo scambio isotipico verso le IgA comprendono sia una combinazione di citochine solubili che proteine di membrana espresse da altri tipi cellulari che legano i recettori espressi dai linfociti B (vedi Cap. 12). Il TGF-β, la principale citochina necessaria per lo scambio isotipico verso le IgA, nell'intestino così come in altri compartimenti mucosi, è prodotto dalle cellule epiteliali e dalle DC del GALT. Inoltre, le DC presenti nel GALT esprimono l'integrina $\alpha_v\beta_8$ che è necessaria per l'attivazione del TGF-β. Diverse molecole che promuovono lo scambio isotipico verso le IgA sono espresse dalle cellule dell'epitelio intestinale o dalle DC del GALT in risposta ai segnali innescati dai TLR una volta attivati dai batteri commensali presenti nel lume intestinale. Per esempio, lo scambio isotipico T-indipendente verso le IgA e le IgG richiede il legame della citochina APRIL, che appartiene alla famiglia del TNF, al recettore TACI espresso dai linfociti B. La citochina APRIL è prodotta dalle cellule

dell'epitelio intestinale in risposta all'attivazione dei ligandi dei TLR prodotti dai batteri commensali. Le cellule dell'epitelio intestinale producono anche la linfopoietina stromale timica (*Thymic Stromal Lymphopoietin*, TSLP) in risposta a segnali mediati dai TLR, e TSLP stimola a sua volta l'ulteriore produzione di APRIL da parte delle DC del GALT. I ligandi dei TLR prodotti dai batteri commensali nell'intestino aumentano anche l'espressione della sintetasi inducibile dell'ossido nitrico che nelle DC porta alla produzione di ossido nitrico. Si ritiene che l'ossido nitrico sia in grado di promuovere lo scambio isotipico verso le IgA sia con un meccanismo T-dipendente sia con un T-indipendente, in parte perché l'ossido nitrico aumenta la trasduzione del TGF-β e la sintesi di APRIL da parte delle DC del GALT. Infine, la produzione di IgA da parte dei linfociti B intestinali dipende almeno in parte dall'acido trans-retinoico, un metabolita della vitamina A prodotto dalle cellule dell'epitelio intestinale e dalle DC del GALT. Il meccanismo mediante il quale l'acido retinoico promuove la produzione di IgA non è tuttavia ancora ben conosciuto. Come già detto, l'acido retinoico è importante anche nell'homing dei linfociti B nell'intestino. Nel GALT e nei linfonodi mesenterici vi è una grande abbondanza di queste molecole rispetto ai tessuti linfoidi non associati alle mucose, come la milza e i linfonodi che drenano la superficie cutanea, e questo spiega la propensione dei linfociti B del GALT allo scambio isotipico verso le IgA.

FIGURA 14-7 Scambio isotipico verso le IgA nell'intestino. Lo scambio isotipico verso le IgA nell'intestino avviene con meccanismi sia T-dipendenti sia T-indipendenti. **A.** Nello scambio isotipico T-dipendente, le DC della cupola subepiteliale delle placche di Peyer catturano gli antigeni batterici veicolati dalle cellule M e migrano verso la zona interfollicolare, dove presentano gli antigeni ai linfociti T naïve $CD4^+$. I linfociti T attivati si differenziano in linfociti T helper follicolari che interagiscono con i linfociti B IgM^+IgD^+ che presentano l'antigene che hanno catturato e processato. Lo scambio isotipico verso le IgA è stimolato da CD40L espresso dai linfociti T che lega CD40 sui linfociti B, insieme all'azione del TGF-β. Questa via T-dipendente produce anticorpi IgA ad alta affinità. **B.** Lo scambio isotipico T-indipendente consiste nell'attivazione dei lingoviyi B IgM^+IgD^+, come le cellule B-1, da parte delle DC. Le DC attivate dai

ligandi dei TLR secernono citochine, quali BAFF e APRIL e TGF-β, che promuovono lo scambio verso IgA. Questa via T-indipendente produce IgA ad affinità relativamente bassa. I meccanismi molecolari dello scambio isotipico sono descritti nel Capitolo 12.

La produzione di IgA da parte delle plasmacellule intestinali risulta aumentata anche dalle proprietà selettive di homing intestinale delle cellule che producono IgA che sono presenti in numero elevato nel GALT e nei linfonodi mesenterici (vedi Fig. 14-5). Alcune delle IgA trasportate attraverso l'epitelio intestinale possono essere prodotte dalle plasmacellule che si differenziano e restano all'interno dei follicoli sottostanti il GALT. Le plasmacellule che secernono le IgA sono tuttavia ampiamente disperse nella lamina propria del tratto gastrointestinale, non solo nei follicoli linfoidi. Come visto in precedenza, i linfociti B attivati che vanno incontro allo scambio isotipico nel GALT e nei linfonodi mesenterici entrano in circolo per poi tornare in maniera selettiva nella lamina propria, dove risiederanno come plasmacellule ormai differenziate.

Una volta secrete le IgA sono trasportate, attraverso le cellule epiteliali, nel lume intestinale mediante un recettore specifico per le IgA/IgM chiamato recettore poli-Ig (Fig. 14-8). Le IgA vengono prodotte in forma di dimeri uniti dalla catena J che viene prodotta contemporaneamente. La catena J è covalentemente legata, tramite ponti disolfuro, alle regioni Fc delle catene α di due molecole di IgA. Le plasmacellule delle mucose producono quantità abbondanti di catene J, molto più elevate rispetto a quelle localizzate nei tessuti non mucosi. Al contrario, le IgA sieriche sono in genere costituite da monomeri privi della catena J. Dalla lamina propria, le IgA dimeriche devono essere trasportate nel lume attraversando l'epitelio. Questa funzione è assolta dal **recettore poli-Ig**. Anche le IgM prodotte dalle plasmacellule della lamina propria sono polimeriche (pentamero), associate tramite un legame covalente alla catena J e sono anch'esse trasportate nelle secrezioni intestinali dal recettore poli-Ig. Per tale motivo questo recettore è chiamato recettore poli-Ig. Questo recettore è sintetizzato dalle cellule epiteliali delle mucosa in seguito a stimolazione da parte di agenti infiammatori, tra cui IL-17, ed è espresso sulla superficie basolaterale delle cellule epiteliali. Il poli-Ig è una glicoproteina integrale

di membrana con cinque domini Ig extracellulari e appartiene quindi alla superfamiglia delle Ig.

FIGURA 14-8 Trasporto delle IgA attraverso la barriera epiteliale. Le IgA sono prodotte nella lamina propria del tessuto mucoso dalle plasmacellule e si legano al recettore poli-Ig presente sul lato basale delle cellule epiteliali. Il complesso è trasportato attraverso la cellula epiteliale e l'IgA legata è rilasciata nel lume in seguito a taglio proteolitico. Questo processo di trasporto, in questo caso dalla superficie basolaterale a quella luminale, è chiamato transcitosi.

Le IgA dimeriche secretorie e le IgM pentameriche legano il recettore poli-Ig attraverso un dominio della catena J (Fig. 14-8). Questo complesso è endocitato dalla cellula epiteliale e, diversamente da altri endosomi che si fondono con i lisosomi, le vescicole contenenti il recettore poli-Ig si fondono direttamente con la membrana plasmatica apicale (luminale) della cellula epiteliale. Questo processo viene detto transcitosi. Sulla superficie cellulare, il recettore poli-Ig è proteoliticamente tagliato, i suoi domini transmembrana e citoplasmatici restano legati alla cellula epiteliale e il dominio extracellulare del recettore, che contiene la molecola Ig, viene rilasciato nel lume intestinale. La componente del recettore poli-Ig che rimane associata alla IgA dimerica nel lume è chiamata componente secretoria. Si ritiene che la componente secretoria che resta legata serva a proteggere le IgA (e le IgM) dalla proteolisi degli enzimi presenti nel lume intestinale, per permettere a questi anticorpi di svolgere le funzioni di neutralizzazione dei microbi e delle tossine presenti nel lume. Il recettore poli-Ig è anche responsabile della secrezione delle IgA nella bile, nel latte, nello sputo, nella saliva e nel sudore.

Le IgG sono presenti nelle secrezioni intestinali in livelli paragonabili alle IgM, ma inferiori rispetto a quelli delle IgA. In alcune secrezioni mucose (per esempio, nel retto, nel tratto genitourinario e nelle vie aeree), i livelli delle IgG sono elevati e spesso superano quelli delle IgA. Il trasporto delle IgG nelle secrezioni mucose è dovuto a un altro recettore specializzato nel processo di transcitosi, FcRn, di cui si è discusso nei Capitoli 5 e 13. Al contrario del recettore poli-Ig, che trasporta le IgA unidirezionalmente (dal lato basale a quello apicale prominente verso il lume), FcRn può effettuare

il trasporto delle IgG bidirezionalmente. Quindi, il trasporto delle IgG da parte del FcRn contribuisce all'immunità umorale nei confronti dei patogeni presenti nel lume intestinale e può anche contribuire al trasporto dei microbi opsonizzati da anticorpi e di altri antigeni dal lume intestinale al GALT.

Le IgA prodotte nei tessuti linfoidi della ghiandola mammaria vengono secrete nel colostro e nel latte materno maturo mediante transcitosi tramite il recettore poli-Ig, e sono responsabili dell'immunità mucosale passiva nei bambini allattati al seno. Durante l'allattamento la ghiandola mammaria della donna contiene un numero elevato di plasmacellule secernenti IgA e il suo epitelio è in grado di accumulare grandi quantità di IgA secretorie. Le plasmacellule presenti nel latte provengono da vari MALT. Esse si accasano nel seno poiché la maggior parte dei plasmoblasti esprime CCR10, indipendentemente dal tessuto linfoide nel quale è stato generato; inoltre il tessuto mammario esprime CCL28, la chemochina che lega CCR10. Pertanto, durante l'allattamento al seno, il neonato ingerisce grandi quantità di IgA materne che gli forniscono un'ampia protezione intestinale verso molteplici microbi. Anche modeste quantità di IgG e IgM vengono secrete nel latte materno e contribuiscono all'immunità passiva del neonato allattato al seno. Molti studi epidemiologici hanno dimostrato che l'allattamento al seno riduce in modo significativo il rischio di malattie diarroiche e di sepsi, specialmente nei Paesi in via di sviluppo, un effetto associato alla presenza di IgA secretorie specifiche per alcune specie di batteri enterotossici, quali *Escherichia coli* e *Campylobacter*.

Immunità dei linfociti T nel tratto gastrointestinale

I linfociti T svolgono nel tratto gastrointestinale un ruolo importante nella protezione contro i microrganismi patogeni e nella regolazione delle risposte verso gli antigeni introdotti con la dieta e derivati dai commensali. Inoltre, i linfociti T contribuiscono alle malattie infiammatorie del tratto gastrointestinale. Come in altri distretti, nell'intestino l'immunità cellulare coinvolge diverse classi di linfociti T ed è influenzata in vario modo dalle diverse sottopopolazioni di DC. In questo paragrafo saranno analizzate le principali caratteristiche dei linfociti T e delle DC nell'intestino.

I linfociti T si trovano nello strato epiteliale dell'intestino, sparsi tra la lamina propria e la sottomucosa, e all'interno delle placche di Peyer e di altri agglomerati follicolari organizzati. Nell'uomo, la maggior parte dei linfociti intraepiteliali è costituita dai linfociti $CD8^+$. Nel topo, circa il 50% dei linfociti T intraepiteliali esprime la forma γδ del recettore per l'antigene, una simile distribuzione si osserva per i linfociti intraepidermici della cute. Nell'uomo, solo il 10% circa dei linfociti intraepiteliali è rappresentato da cellule γδ, ma questa proporzione è sempre maggiore di quella trovata in altri tessuti. Sia i linfociti intraepiteliali, che esprimono il TCR αβ, sia quelli che esprimono il recettore γδ mostrano una limitata diversificazione del recettore per l'antigene. Questi risultati supportano l'idea che i linfociti intraepiteliali della mucosa abbiano un limitato spettro di specificità, distinto da quella della maggior parte dei linfociti T. Questo limitato repertorio si potrebbe essere evoluto allo scopo di riconoscere i microrganismi che vengono comunemente incontrati a livello della superficie epiteliale. I linfociti T della lamina propria sono prevalentemente $CD4^+$ e la maggior parte di essi possiede il fenotipo dei linfociti T effettori attivati o di cellule della memoria, queste ultime con un fenotipo effettore della memoria (vedi Cap. 9). Ricordiamo che i linfociti T effettori e della memoria derivano dall'attivazione nel GALT e nei linfonodi mesenterici di precursori naïve che dopo attivazione entrano nel circolo ematico per tornare preferenzialmente nella lamina propria (vedi Fig. 13-5). I linfociti T delle placche di Peyer e presenti nei follicoli adiacenti all'epitelio intestinale comprendono principalmente le cellule T helper $CD4^+$, tra cui i linfociti T helper follicolari e le cellule T regolatorie.

Le DC e i macrofagi sono abbondanti a livello gastrointestinale e possono partecipare all'attivazione delle risposte dei linfociti T effettori o delle cellule T regolatorie deputate all'inibizione delle risposte nei confronti di antigeni ingeriti e microrganismi commensali. Nell'intestino e in altri tessuti mucosali, alcune DC e macrofagi proiettano le loro protusioni dendritiche tra le cellule epiteliali per campionare il contenuto luminale. Una volta catturato l'antigene, le DC migrano attraverso i vasi linfatici, nei linfonodi mesenterici dove presentano gli antigeni proteici processati ai linfociti T naïve e inducono il loro differenziamento in cellule effettrici che producono IFN-γ, IL-17 o IL-4 o in linfociti T regolatori $FoxP3^+$. Anche i macrofagi tessutali dell'intestino possono promuovere l'espansione locale

dei linfociti T regolatori. La capacità delle cellule dendritiche e dei macrofagi di favorire il differenziamento e l'espansione dei linfociti T regolatori dipende dalla loro capacità di produrre TGF-β e acido retinoico al momento della presentazione dell'antigene.

Nel tratto gastrointestinale, le varie classi di linfociti T CD4$^+$ sono generate in risposta a diverse specie microbiche. Nel Capitolo 10 è stato introdotto il concetto che le diverse sottopopolazioni di linfociti T helper secernono diverse citochine e sono specializzate nella protezione contro diversi tipi di microbi. Questo concetto è particolarmente rilevante nel sistema immunitario associato alle mucose. La microflora batterica commensale dell'intestino esercita una profonda influenza sul fenotipo dei linfociti T in condizioni omeostatiche.

- ***Linfociti T_H17.*** Studi sperimentali in modelli murini hanno evidenziato come alcune classi di batteri, o in alcuni casi specifici batteri, siano in grado di modificare il profilo delle citochine prodotte dai linfociti T. Per esempio, la lamina propria dell'intestino tenue di animali sani, a differenza di quella del colon, è particolarmente ricca di cellule secernenti l'IL-17; la presenza di linfociti T_H17 dipende dalla colonizzazione dell'intestino da parte di alcuni ceppi batterici (batteri filamentosi segmentati) nel periodo postnatale. In condizioni omeostatiche, la presenza di linfociti T_H17 è necessaria per la protezione contro specie di batteri patogene (per esempio *Citrobacter rodentium*). Un altro esempio di modifiche causate nel fenotipo dei linfociti dell'intestino dalla microflora batterica è dovuto alla colonizzazione di ceppi di *Bacteroides fragilis*. A seconda che essi esprimano il polisaccaride A o che non lo esprimano, questi batteri sono in grado di indurre promuovere lo sviluppo di linfociti T che producono l'IL-17 o di linfociti T regolatori che producono l'IL-10. I linfociti T_H17 svolgono un ruolo fondamentale nel mantenimento della funzione di barriera dell'epitelio delle mucose grazie all'azione delle due citochine chiave che esse producono, l'IL-17 e l'IL-22, che, come già menzionato, sono anche prodotte dalle cellule linfoidi innate dell'intestino. I recettori per entrambe queste citochine sono espressi dai linfociti dell'epitelio intestinale ed entrambi promuovono

l’espressione di importanti proteine con funzione di barriera, come le mucine e le β-defensine, che proteggono le cellule epiteliali contro il danno causato da microbi. I meccanismi responsabili dell’azione dei microrganismi sulle risposte dei linfociti T non sono ancora ben definiti, ma probabilmente coinvolgono segnali diretti sia verso le cellule dell’epitelio intestinale sia verso le DC. Questi segnali modificano il fenotipo e il profilo delle citochine prodotte dalle DC, che a loro volta influenzano il differenziamento dei linfociti T al momento della presentazione dell’antigene alle cellule naïve.

- ***Linfociti T_H2.*** Le infezioni intestinali da elminti causano un’importante risposta T_H2, che risulta molto efficacie nell’eliminazione degli elminti. Infatti, le citochine T_H2 IL-4 e IL-13 contribuiscono all’aumento delle secrezioni di fluidi e muco, inducono la contrazione delle cellule muscolari lisce e promuovono l’aumento della motilità intestinale.

Controllo dell’immunità nel tratto gastrointestinale da parte dei linfociti T regolatori e delle citochine

I linfocit T regolatori sono abbondanti nel GALT e prevengono le reazioni infiammatorie contro i microrganismi commensali intestinali. Si stima che la percentuale di linfociti T regolatori $CD4^+$ $FoxP3^+$ nella lamina propria sia circa il doppio rispetto a quella presente negli altri tessuti linfoidi periferici. Molti di questi linfociti sono probabilmente generati nell’intestino in risposta agli antigeni incontrati in quella sede e appartengono alla categoria dei linfociti T regolatori periferici (vedi Cap. 15). I fattori che contribuiscono alla generazione di questa popolazione comprendono le DC $CD103^+$, la produzione locale di acido retinoico (che promuove l’espressione di FoxP3) e la produzione locale di TGF-β (che promuove anche l’espressione delle FoxP3 e inibisce la polarizzazione T_H1 e T_H2). Come si vedrà nel Capitolo 15, si ritiene che i linfociti T regolatori abbiano il compito di inibire le risposte immunitarie mediante diversi meccanismi; tra questi, quello dominante nell’intestino sembra essere la

produzione della citochina immunosoppressiva IL-10, come si vedrà più avanti.

Diverse citochine, tra cui il TGF-β, l'IL-10 e l'IL-2, sembrano avere un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi nel sistema immunitario intestinale e i deficit di queste citochine o dei loro recettori danno origine a processi patologici infiammatori. Molte delle attuali conoscenze sul ruolo delle citochine nell'intestino deriva da studi effettuati in topi knockout per tali citochine o per i loro recettori. La principale caratteristica del fenotipo di animali che presentano deficit genetico per TGF-β, IL-10, il recettore di IL-10 o di IL-2 e il suo recettore è l'infiammazione incontrollata dell'intestino. Mutazioni nei geni di IL-10 e del suo recettore si associano a gravi malattie infiammatorie intestinali che si manifestano in età pediatrica, a conferma dell'importanza di questa citochina nella prevenzione dell'infiammazione patologica intestinale nell'uomo. L'infiammazione massiva osservata in assenza di queste citochine, o dei loro recettori, è molto probabilmente causata dall'immunità innata e da quella adattativa che si attivano nei confronti della flora commensale intestinale. Infatti l'infiammazione non si verifica in animali allevati in condizioni germ-free. La fonte cellulare di tali citochine e le cellule bersaglio che esprimono questi recettori particolarmente critici nella prevenzione dell'infiammazione intestinale non sono completamente conosciute. Per cercare di capire quali tipi cellulari siano davvero importanti, sono stati utilizzati modelli sperimentali murini nei quali queste citochine, i loro recettori e i segnali innescati dall'attivazione di questi recettori sono stati selettivamente deleti a livello genetico in particolari tipi cellulari. Nel caso di TGF-β e IL-10, esistono evidenze sperimentali che suggeriscono che la fonte importante di queste citochine siano i linfociti T regolatori. Per esempio, l'inattivazione selettiva del gene IL-10 nelle cellule $FoxP3^+$ provoca una severa colite, in assenza di altre manifestazioni di malattia cronica; questi risultati suggeriscono che IL-10 prodotta dai linfociti T regolatori svolga un ruolo critico nel mantenere l'omeostasi nel tratto gastrointestinale. È possibile che anche i macrofagi costituiscano un'importante fonte di IL-10. Le cellule bersaglio dell'azione di TGF-β e IL-10 sono le DC, i linfociti T effettori e cellule effettrici dell'immunità innata, come macrofagi e cellule epiteliali. Le malattie infiammatorie dell'intestino in animali resi geneticamente deficienti per IL-2 o per il suo

recettore, sono provocate dal mancato sviluppo dei linfociti T regolatori, che necessitano dell'IL-2 (vedi Cap. 15).

Tolleranza orale e vaccini orali

La tolleranza orale è la tolleranza immunologica sistemica adattativa verso antigeni ingeriti o somministrati per via orale. La tolleranza orale è stata ben descritta nei modelli sperimentali murini. Topi nutriti con dosi elevate di un antigene proteico possono presentare alterate risposte umorali e cellulari verso lo stesso antigene somministrato attraverso altre vie, come per esempio quella cutanea. Un fenomeno simile può essere dimostrato quando si somministrano antigeni attraverso le fosse nasali nella mucosa respiratoria e il termine generale di tolleranza mucosale è usato per descrivere la tolleranza prodotta dalla somministrazione di antigeni per via orale o nasale. Si ritiene che il ruolo fisiologico della tolleranza orale sia la prevenzione di risposte immunitarie potenzialmente dannose verso le proteine alimentari e i batteri commensali. I meccanismi alla base della tolleranza orale non sono ben noti, ma probabilmente sono simili a quelli della tolleranza periferica, di cui si parlerà nel Capitolo 15, come l'anergia, la delezione clonale e l'inibizione esercitata dai linfociti T regolatori. La propensione del sistema immunitario dell'intestino a sopprimere le risposte locali verso gli antigeni presenti nel lume intestinale potrebbe riflettersi anche in altri distretti anatomici a causa della migrazione dei linfociti T regolatori in altri tessuti e del fatto che la delezione clonale e l'anergia dei linfociti T effettori generatasi nell'intestino potrebbe rendere inattiva la risposta verso gli stessi antigeni in altri distretti. I tentativi di trattare le malattie autoimmuni o allergiche mediante la somministrazione orale o nasale di autoantigeni finora non hanno tuttavia dato risultati promettenti.

La somministrazione orale di antigeni nel contesto di una concomitante stimolazione dell'immunità innata può portare a risposte immunitarie efficaci, come dimostra l'efficacia dei vaccini orali nell'indurre risposte anticorpali contro i virus. Questi vaccini contengono virus vivi attenuati che possono infettare le DC dell'intestino e stimolare forti risposte innate che promuovono l'attivazione dei linfociti T e B.

Ruolo del microbioma commensale nella regolazione del sistema immunitario

Il microbioma intestinale umano comprende tutti i batteri commensali che normalmente risiedono nell'intestino e migliaia di specie di virus, funghi e protozoi. L'uomo e il relativo microbioma intestinale hanno sviluppato meccanismi evolutivi comuni tesi al reciproco beneficio, che comprendono meccanismi di difesa nei confronti di questi microrganismi insieme a meccanismi volti a minimizzare le risposte immunitarie proinfiammatorie nei confronti dei microrganismi commensali. Una conseguenza di questo processo coevolutivo è la profonda influenza del microbioma sul sistema immunitario. Il microbioma subisce modificazioni con l'età, la dieta e le malattie, e studi condotti in modelli murini suggeriscono che tali cambiamenti hanno un profondo impatto sulla funzione immunitaria sia a livello locale intestinale sia a livello sistemico.

I microrganismi commensali dell'intestino sono necessari per l'attivazione e la regolazione delle risposte innate locali e possono anche influenzare le risposte sistemiche. Studi condotti in modelli murini hanno dimostrato che i batteri commensali sono necessari per la proliferazione e la riparazione delle lesioni alla barriera epiteliale intestinale; tale azione è attivata dai PAMP della parete cellulare batterica che si legano ai TLR espressi dalle cellule epiteliali. Come già menzionato, la microflora intestinale stimola l'espressione delle mucine e dei peptidi antimicrobici (tra cui la lectina di tipo C, REGIIIγ) che prevengono la colonizzazione dei batteri Gram-positivi. Inoltre, numerosi studi hanno dimostrato come i prodotti dei batteri commensali dell'intestino siano in grado di influenzare la funzionalità dei neutrofili circolanti e dei macrofagi anche a livello sistemico. Per esempio, gli acidi grassi a catena corta prodotti dai batteri intestinali possono modulare le risposte infiammatorie dei neutrofili, mentre i frammenti di peptidoglicano dei batteri intestinali possono potenziare la capacità microbicida dei neutrofili circolanti verso i batteri Gram-positivi. Analogamente, i batteri intestinali sembrano necessari nella regolazione delle funzioni antivirali sistemiche dei macrofagi, delle cellule dendritiche e delle cellule NK.

I microrganismi commensali intestinali influenzano le risposte immunitarie adattative locali e sistemiche. La produzione di IgA, che è il principale meccanismo dell'immunità adattativa per la protezione contro l'invasione microbica attraverso la barriera epiteliale intestinale, dipende dalla presenza di flora nel lume intestinale. Gli antigeni dei batteri commensali attivano le risposte IgA T-dipendenti. Inoltre, i microrganismi commensali stimolano l'espressione di fattori, quali BAFF, APRIL e acido retinoico, che sono necessari per lo scambio isotipico verso le IgA nelle risposte T-dipendente e T-indipendente (citate in precedenza). Le IgA intestinali, hanno il ruolo di impedire ai microrganismi commensali di raggiungere la barriera epiteliale, contribuendo a ridurre le risposte innate verso tali microbi e a limitare anche l'attivazione dei linfociti B e le risposte anticorpali, sia a livello locale che sistemico. Per esempio, i livelli di IgE e il numero di basofili circolanti, e le reazioni allergiche in tessuti diversi dall'intestino, che dipendono dai mastociti, sono particolarmente elevate in animali germ-free. Alcune specie di microrganismi commensali intestinali sono necessarie per l'accumulo a livello intestinale dei linfociti T_H17 e la presenza di queste specie riduce la resistenza verso alcune specie patogene intestinali, anche se potrebbe aumentare la suscettibilità a sviluppare malattie autoimmuni in sede extraintestinale. Altre specie commensali contribuiscono allo sviluppo dei linfociti Treg.

Nell'uomo, l'impatto della microflora intestinale sulle risposte immunitarie locali e sistemiche è dimostrata da numerose osservazioni cliniche e sperimentali. La normale flora sembra necessaria per prevenire le risposte innate e l'infiammazione causata dai batteri patogeni. Per esempio, il trattamento antibiotico delle infezioni in sede extraintestinale produce sempre un'alterazione della composizione della microflora intestinale, e tale effetto si associa a un aumentato rischio di infezioni batteriche patologiche nel colon, specialmente da parte di *Clostridium difficile* (*C. difficile*). I pazienti con infezione cronica da *C. difficile* traggono beneficio da trapianti fecali somministrati oralmente, che sono in grado di ripopolare l'intestino con la flora di individui sani. I pazienti con malattia infiammatoria dell'intestino (trattata più avanti) possiedono una flora intestinale anomala; in alcuni di questi pazienti sia il trattamento antibiotico sia i trapianti fecali sono risultati efficaci.

La modalità con cui la flora intestinale commensale umana è in grado di influenzare la salute del sistema immunitario è in gran parte sconosciuta. Il rischio di sviluppare malattie allergiche, tra cui l'asma, è stato associato a variazioni della microflora che avvengono nel corso della prima infanzia come conseguenza del tipo di parto (vaginale o taglio cesareo), di allattamento e dell'uso di antibiotici. Attualmente, i microbiomi di varie popolazioni di individui sani e malati vengono caratterizzati mediante approcci genetici e i dati generati potrebbero condurre ad una migliore comprensione dei meccanismi attraverso i quali il sistema immunitario umano viene regolato dai batteri intestinali.

Malattie correlate alle risposte immunitarie nell'intestino

Considerando l'abbondanza delle cellule del sistema immunitario e la loro costante attività nella mucosa intestinale, non sorprende il fatto che esistano molte malattie intestinali correlate ad abnormi risposte immunitarie. Queste malattie sono in genere provocate da risposte sregolate verso microrganismi commensali o verso gli antigeni che introduciamo con il cibo. Qui saranno presi in considerazione alcuni esempi di queste patologie, ma per una trattazione esaustiva si consiglia la lettura di testi specializzati.

Malattie infiammatorie dell'intestino

Le malattie infiammatorie dell'intestino comprendono un gruppo eterogeneo di disordini caratterizzati da infiammazione cronica con fasi remittenti, localizzate nell'intestino tenue e nel crasso, verosimilmente dovute a risposte alterate verso batteri commensali. I due principali tipi di malattie infiammatorie dell'intestino sono il **morbo di Crohn**, che può interessare l'intero spessore della parete intestinale in ogni parte del tratto gastrointestinale, ma più frequentemente coinvolge l'ileo terminale, e la **colite ulcerosa**, ristretta invece alla mucosa del colon. La sintomatologia comprende dolore addominale, vomito, diarrea e calo ponderale. I trattamenti utilizzati includono farmaci antinfiammatori, come sulfosalazina, corticosteroidi, farmaci biologici anti-TNF e antimetaboliti. Diverse indicazioni suggeriscono che il morbo di Crohn e la colite ulcerosa siano il risultato di difetti della regolazione delle risposte immunitarie verso

i microrganismi commensali dell'intestino in individui geneticamente suscettibili, sebbene l'eziologia di questi disordini sia poco conosciuta. Diverse anomalie immunologiche possono contribuire all'insorgenza delle malattie infiammatorie intestinali.

- ***Difetti dell'immunità innata verso i commensali intestinali.*** Abbiamo già accennato nella presente trattazione alla possibilità che le malattie infiammatorie dell'intestino derivino da uno o da entrambi i seguenti difetti dell'immunità innata. In primo luogo, ci possono essere difetti nell'espressione di alcune molecole, come le defensine, che provocano un aumento dell'invasione dei batteri commensali attraverso l'epitelio intestinale. In secondo luogo, ci può essere un'inadeguata regolazione negativa delle risposte verso i microrganismi commensali. I polimorfismi nel gene che codifica per il sensore citoplasmatico dell'immunità innata NOD2 sono associati a un tipo di morbo di Crohn e possono portare a anomalie in entrambi questi aspetti dell'immunità innata.

- ***Alterate risposte T_H17 e T_H1.*** L'analisi delle risposte T in modelli animali e in pazienti affetti da malattia infiammatoria dell'intestino indica che nei segmenti dell'intestino interessati dalla malattia è presente un'attiva risposta T_H17. Il morbo di Crohn è anche caratterizzato dalla formazione di granulomi causati dai linfociti T_H1 che producono IFN-γ (vedi Cap. 19). Su queste informazioni si basano le attuali sperimentazioni cliniche nelle quali i pazienti vengono trattati con anticorpi monoclonali che legano la proteina p40, una proteina condivisa dall'IL-23 e dall'IL-12. Come già detto, l'IL-23 è necessaria per le risposte dei linfociti T_H17 e l'IL-12 è invece fondamentale per le risposte T_H1. Trials clinici con antagonisti dell'IL-17 non sono invece risultati efficaci, suggerendo che un'eccessiva produzione di IL-17 potrebbe, di per sé, non essere responsabile di questi quadri patologici.

- ***Difetto dei linfociti T regolatori.*** È possibile che le malattie infiammatorie dell'intestino siano causate anche da un inadeguato livello di soppressione delle risposte verso microrganismi commensali

da parte dei linfociti T regolatori. Le indicazioni che supportano tale ipotesi derivano da studi condotti in modelli sperimentali murini nei quali l'assenza dei linfociti T regolatori è causa di malattia. Infatti, uno dei primi esperimenti che dimostravano l'esistenza di questi linfociti si basava sullo sviluppo di patologie infiammatorie gastrointestinali in topi immunodeficienti nei quali venivano iniettate cellule T $CD4^+CD25^-$, le quali, oggi è noto, contengono i precursori dei linfociti T effettori, ma mancano dei linfociti T regolatori $CD4^+CD25^+$. Come già accennato, anche topi difettivi in questi linfociti a causa della delezione dei geni *Il2* o *Il2r*, o knockout per il gene *Foxp3*, sviluppano colite. Nell'uomo, le mutazioni del gene *FOXP3* provocano il mancato sviluppo dei linfociti T regolatori e l'insorgenza di una malattia definita sindrome da immunodisregolazione, poliendocrinopatia, enteropatia X-linked (*Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked*, IPEX), caratterizzata da grave infiammazione intestinale e da manifestazioni autoimmuni in svariati tessuti. Tutte queste osservazioni sono consistenti con il ruolo cruciale svolto dai linfociti T regolatori nel mantenimento dell'omeostasi intestinale, tuttavia non è in realtà noto se il difetto di questi linfociti sia generalmente responsabile della maggior parte dei casi di malattia infiammatoria dell'intestino.

- ***I polimorfismi dei geni associati a macroautofagia e le alterazioni della struttura* (folding) *associate a stress del reticolo endoplasmatico sono fattori di rischio per le malattie infiammatorie dell'intestino***. Evidenze sperimentali suggeriscono che il legame tra la malattia infiammatoria dell'intestino e le risposte a proteine non "ripiegate" correttamente (*unfolded*) e a geni connessi ai processi di autofagia è associato alla diminuita secrezione di enzimi antimicrobici e di defensine da parte delle cellule di Paneth. La macroautofagia è un processo mediante il quale le cellule sequestrano gli organelli citoplasmatici all'interno degli autofagosomi, i quali si fondono con i lisosomi, promuovendo l'eliminazione degli organelli. Le varianti genetiche dell'autofagia (come *ATG16L1* e *IRGM*), che sono associate con il morbo di Crohn, provocano un'alterazione nelle cellule di Paneth che, per ragioni non ancora chiarite, determina la riduzione

della secrezione di lisozima e defensine nel lume intestinale. Lo stress del reticolo endoplasmatico avviene quando proteine con conformazione alterata si accumulano nel reticolo endoplasmatico. Questo porta all'attivazione di una serie di proteine, tra cui il fattore di trascrizione XBP-1, che interviene a bloccare la traduzione delle proteine e ad aumentare l'espressione di altre molecole (chaperonine) che promuovono il corretto ripiegamento (*folding*) delle proteine. Le cellule di Paneth, come altre cellule secretorie, richiedono una corretta conformazione delle proteine per una corretta secrezione.

Malattia celiaca

La malattia celiaca (enteropatia glutine-sensibile o sprue non tropicale) è una malattia infiammatoria della mucosa dell'intestino tenue causata da risposte immunitarie contro le proteine del glutine presenti nel frumento. La malattia celiaca è caratterizzata da infiammazione cronica della mucosa dell'intestino tenue, che provoca atrofia dei villi, malassorbimento e vari difetti nutrizionali che causano anche manifestazioni extraintestinali. La malattia viene trattata con l'assunzione di una dieta a base di alimenti senza glutine. I pazienti producono anticorpi IgA e IgG specifici per il glutine così come autoanticorpi specifici per la transglutaminasi 2A, un enzima che modifica la gliadina, una proteina del glutine. Si ritiene che questi autoanticorpi si formino quando i linfociti B endocitano la transglutaminasi covalentemente associata alla gliadina e presentano i peptidi della gliadina ai linfociti T helper, promuovendo una risposta anticorpale antitransglutaminasi. Non si sa se questi anticorpi contribuiscano allo sviluppo della malattia, ma essi rappresentano un marker diagnostico molto sensibile. Vi sono forti indicazioni che le risposte dei linfociti T $CD4^+$ contro la gliadina siano coinvolte nella patogenesi della malattia. I linfociti T specifici per i peptidi della gliadina sono presenti nei pazienti celiaci e il processo infiammatorio nell'intestino coinvolge i linfociti T e le citochine da essi prodotti. Esiste un'elevata predisposizione per lo sviluppo di enteropatia sensibile al glutine in soggetti portatori dei due alleli HLA di classe II, HLA-DQ2 e HLA-DQ8, in quanto i peptidi della gliadina possono formare un legame molto forte con le molecole MHC codificate da questi alleli. Nel Capitolo 15 sarà descritta l'associazione delle patologie

autoimmuni con gli alleli MHC. Oltre alle risposte dei linfociti T $CD4^+$, anche l'uccisione delle cellule epiteliali intestinali da parte dei linfociti $CD8^+$ citotossici (*Cytotoxic T Lynphocytes*, CTL) può contribuire alla malattia celiaca, anche se la fonte dei peptidi realmente riconosciuti dai CTL non è ancora chiara.

Altre patologie

Le allergie alimentari sono causate da risposte T_H2 a svariate proteine alimentari che provocano risposte infiammatorie acute nell'intestino e risposte sistemiche. Le allergie derivano da risposte IgE T_H2 verso antigeni ambientali (allergeni), che possono essere sia proteine sia sostanze chimiche che modificano le proteine self. Nel caso delle allergie alimentari, gli antigeni ambientali vengono ingeriti e questo rappresenta un altro esempio dell'inadeguatezza della tolleranza immunologica verso gli antigeni alimentari. Gli anticorpi antiallergene si legano ai recettori Fc espressi sui mastociti e la successiva esposizione all'allergene determinerà il cross-linking dei recettori Fc, l'attivazione dei mastociti e il rilascio di potenti amine proinfiammatorie, di mediatori lipidici e di citochine. Nella lamina propria dell'intestino vi è un numero abbondante di mastociti, pertanto l'ingerimento di un allergene da parte di un individuo che ha già sviluppato una risposta IgE e T_H2 verso lo stesso allergene provocherà l'attivazione dei mastociti e le rispettive conseguenze patologiche. Le citochine prodotte dai linfociti T_H2 sono anche in grado di stimolare la peristalsi intestinale e innescare i sintomi tipici delle allergie alimentari in assenza della partecipazione diretta delle IgE. Queste reazioni possono determinare sintomi gastroenterici quali nausea, vomito, diarrea e dolore addominale, ma gli allergeni possono anche essere assorbiti dal circolo ematico e determinare l'attivazione dei mastociti in molti tessuti, dando luogo a manifestazioni sistemiche. Si discuterà più dettagliatamente delle reazioni allergiche nel Capitolo 20.

Prolungate risposte immunitarie verso microrganismi gastrointestinali possono dare luogo all'insorgenza di tumori nel tratto gastrointestinale. L'esempio documentato meglio è rappresentato dai linfomi cosiddetti MALT che si sviluppano nello stomaco di individui con infezione cronica

da *Helicobacter pylori*. Si tratta di tumori che originano dalla trasformazione maligna dei linfociti B follicolari della lamina propria dello stomaco. Si ritiene che *H. pylori* scateni una reazione infiammatoria che promuove lo sviluppo e la crescita di tumori causati da eventi oncogenetici intrinseci ai linfociti B. Sorprendentemente, se i linfomi gastrici MALT venissero diagnosticati prima che si propaghino oltre la parete gastrica, i pazienti potrebbero essere curati con terapia antibiotica contro l'infezione da *H. pylori*.

RISPOSTA IMMUNITARIA IN ALTRI DISTRETTI MUCOSALI

Come nella mucosa gastrointestinale, le mucose del sistema respiratorio e genitourinario e la congiuntiva devono svolgere la funzione di barriera contro l'invasione di diversi microbi ambientali e garantire un equilibrio tra le risposte protettive contro i microbi e la soppressione delle risposte verso gli organismi commensali. Molte delle caratteristiche già descritte per l'immunità gastrointestinale sono condivise dall'immunità mucosale in questi diversi distretti. Queste caratteristiche comprendono la presenza di barriere epiteliali relativamente impermeabili rivestite da muco e in grado di secernere le defensine, l'accumulo localizzato di tessuto linfoide sottoepiteliale, la costante cattura di antigeni localizzati all'esterno delle barriere da parte di cellule del sistema immunitario che si trovano nella barriera, l'integrazione costante dei segnali proinfiammatori e inibitori generati dai prodotti microbici che legano i TLR espressi dalle cellule epiteliali e dalle DC, il ruolo cruciale dell'immunità umorale, basata sulla presenza di IgA secretorie, nel prevenire l'invasione microbica, la presenza di sottopolazioni di DC con funzioni effettrici e regolatorie. Oltre a quelle condivise, ciascun tessuto mucoso presenta caratteristiche uniche che riflettono le diverse funzioni e l'anatomia degli organi di cui fa parte e la gamma distinta di antigeni ambientali e microbici che sono presenti in ciascun sito. Saranno prese in considerazione alcune delle principali caratteristiche di questi organi, con particolare riguardo al sistema respiratorio.

Immunità nel sistema respiratorio

La mucosa del sistema respiratorio delimita le fosse nasali, il nasofaringe, la trachea e l'albero bronchiale. Gli alveoli, le terminazioni a fondo cieco delimitate dall'epitelio delle vie respiratorie bronchiali, possono essere considerati parte della mucosa respiratoria. L'inalazione espone la mucosa respiratoria a un'ampia varietà di sostanze estranee, che comprendono microrganismi infettivi presenti nell'aria, pollini di piante, particelle di polvere e altri antigeni ambientali. La flora microbica delle vie aeree è molto meno densa e diversificata rispetto a quella intestinale e le vie aeree profonde e gli alveoli sono generalmente sterili. Meccanismi simili si sono tuttavia evoluti anche nel sistema immunitario della mucosa respiratoria per raggiungere un equilibrio tra l'attivazione, per garantire la protezione contro gli agenti patogeni, e l'inibizione per evitare risposte inutili o eccessive che potrebbero compromettere le funzioni fisiologiche. Il malfunzionamento del sistema immunitario nel controllare le infezioni broncopolmonari e le risposte immunitarie e infiammatorie esagerate rappresentano le principali cause di morbilità e mortalità in tutto il mondo.

Immunità innata nel sistema respiratorio

L'epitelio ciliato colonnare pseudostratificato che delimita la maggior parte della mucosa delle vie respiratorie, tra cui le fosse nasali, il nasofaringe e l'albero bronchiale, svolge funzioni di barriera fisica e chimica simili all'epitelio intestinale, in virtù delle giunzioni strette tra le cellule e la secrezione di muco, le defensine e le catelicidine. Il muco nelle vie aeree intrappola le sostanze estranee, tra cui i microbi, mentre le ciglia spostano il muco e i microbi intrappolati fuori dai polmoni. L'importanza del muco e delle ciglia nella protezione dell'immunità innata polmonare è dimostrata dall'aumento della frequenza di gravi infezioni broncopolmonari che insorgono in soggetti con ridotta funzione delle ciglia, come i forti fumatori, o con alterata produzione di muco, come i pazienti affetti da fibrosi cistica.

Le risposte innate negli alveoli svolgono funzioni antimicrobiche, ma sono strettamente controllate per prevenire l'infiammazione, che comprometterebbe gli scambi gassosi. Gli alveoli sono suscettibili di facile diffusione di infezioni da broncopolmonite, e le cellule del rivestimento alveolare possono essere direttamente infettate da virus. Le proteine A

(*Surfactant Protein A,* SP-A) e D (*Surfactant Protein* D, SP-D) del surfactante, secrete negli spazi alveolari, appartengono alla famiglia delle collectine (vedi Cap. 4) e si legano ai carboidrati dei PAMP presenti sulla superficie di molti patogeni. Questi surfactanti sono coinvolti nella neutralizzazione virale e nell'eliminazione dei microbi dagli spazi aerei, ma possono anche sopprimere le risposte infiammatorie e allergiche nei polmoni. Per esempio, SP-A inibisce i segnali dei TLR2 e TLR4 e l'espressione di citochine infiammatorie nei macrofagi alveolari. Inoltre, SP-A lega anche il TLR4, inibendo il legame con i lipopolisaccaridi. Le proteine SP-A e SP-D riducono inoltre l'attività fagocitica dei macrofagi alveolari.

I macrofagi alveolari rappresentano la maggior parte delle cellule presenti negli spazi alveolari. Queste cellule sono funzionalmente distinte dai macrofagi presenti nella maggior parte degli altri tessuti, in quanto mantengono un fenotipo antinfiammatorio. Essi esprimono l'IL-10, l'ossido nitrico e il TGF-β e sono scarsamente fagocitici rispetto ai macrofagi residenti in altri tessuti, come la milza e il fegato. I macrofagi alveolari inibiscono le risposte T così come la funzione di presentazione dell'antigene da parte delle DC $CD103^+$ delle vie aeree.

Immunità adattativa nel sistema respiratorio

Come in altri tessuti mucosi, l'immunità protettiva umorale nelle vie respiratorie è dominata dalla presenza di IgA secretorie, sebbene in quantità inferiore a quella del tratto gastrointestinale. Le IgA secretorie svolgono un ruolo importante nelle alte vie respiratorie. Le sedi anatomiche di attivazione dei linfociti B naïve, del differenziamento e dello scambio isotipico verso le IgA possono variare, ma generalmente sono le tonsille e le adenoidi nel nasofaringe e i linfonodi mediastinici e peribronchiali. Nella lamina propria delle basse vie aeree vi sono relativamente pochi aggregati linfoidi o follicoli linfoidi isolati in confronto all'intestino e probabilmente anche una ridotta risposta umorale. L'homing delle plasmacellule che secernono le IgA nel tessuto delle vie aeree, in prossimità dell'epitelio della mucosa respiratoria, dipende dalla chemochina CCL28, secreta dall'epitelio respiratorio, e dal suo recettore CCR10, espresso dalle plasmacellule. Le IgA e le IgG sono trasportate nel lume delle vie aeree dallo stesso

meccanismo di trasporto transcellulare presente nell'intestino a opera dei recettori poli-Ig e FcRn. Le risposte nei confronti degli antigeni delle vie aeree IgE-dipendenti avvengono di frequente e sono coinvolte in malattie allergiche del sistema respiratorio, come la febbre da fieno e l'asma. Le IgE svolgono funzioni effettrici pro-infiammatorie quando sono legate ai mastociti, che sono abbondanti nelle vie respiratorie.

Le risposte T polmonari hanno inizio in seguito alla cattura degli antigeni da parte delle DC e alla presentazione di questi antigeni ai linfociti T naïve presenti nei linfonodi peribronchiali e mediastinici. Nella mucosa delle vie respiratorie è presente una rete di DC che può essere suddivisa in diverse sottopopolazioni in base all'espressione di marcatori di superficie e alla loro localizzazione. Una sottopopolazione di queste cellule dendritiche bronchiali è in grado di estendere i dendriti tra le cellule dell'epitelio bronchiale nel lume delle vie respiratorie. Queste DC catturano gli antigeni inalati, migrano ai linfonodi drenanti, presentano gli antigeni processati ai linfociti T naïve e hanno la capacità di indirizzare il differenziamento di questi linfociti in senso T_H2. I linfociti T effettori tornano poi nella mucosa bronchiale, dove possono essere riattivati dagli stessi allergeni presentati dalle DC della lamina propria. Questa via è considerata fondamentale per l'insorgenza dell'asma allergica (vedi Cap. 20). Un'altra sottopopolazione di DC è stata identificata nella lamina propria al di sotto delle cellule epiteliali.

Immunità nel sistema genitourinario

Come nelle altre barriere mucose, la difesa dell'immunità innata contro l'invasione microbica e le infezioni della mucosa genitourinaria si basa principalmente sul rivestimento epiteliale. L'epitelio squamoso superficiale delimita la mucosa vaginale e l'uretra terminale del maschio e un singolo strato di epitelio colonnare, che secerne muco, delimita il tratto genitale femminile superiore. L'epitelio vaginale contiene cellule di Langerhans e una varietà di DC e di macrofagi sono stati descritti al di sotto dell'epitelio nella vagina, nell'endocervice e nell'uretra. Nella mucosa genitale risiedono anche linfociti B e T. Le differenze nel fenotipo delle DC e dei macrofagi nella mucosa genitale femminile rispetto a quelli del tratto gastrointestinale possono essere alla base della maggiore suscettibilità di

questi ultimi all'infezione da HIV. Nella mucosa genitourinaria, la specializzazione distrettuale del sistema immunitario adattativo è scarsa e manca del MALT. A differenza di altre mucose, nelle quali l'isotipo dominante degli anticorpi è rappresentato dalle IgA, la maggior parte degli anticorpi presenti nelle secrezioni genitali sono IgG, circa la metà delle quali sono prodotte da plasmacellule che risiedono nella mucosa del tratto genitale, mentre la restante parte deriva dal circolo ematico.

SISTEMA IMMUNITARIO CUTANEO

La cute è formata da due strati principali, l'epidermide, esterna, costituita soprattutto da cellule epiteliali e da una sottile membrana basale, e il derma sottostante composto da tessuto connettivo e strutture annessiali specializzate, come i follicoli piliferi e le ghiandole sudoripare. All'interno di questi due strati, diversi tipi di cellule e i loro prodotti, che compongono il sistema immunitario cutaneo (Fig. 14-9), costituiscono la barriera fisica e svolgono di difesa contro i microrganismi. La cute di un adulto ha una superficie di circa 2 m^2 e rappresenta la seconda più grande barriera del corpo contro i microbi ambientali e altre sostanze estranee. Data la sua posizione all'interfaccia con l'ambiente esterno, la cute è normalmente colonizzata da molti microrganismi ed è spesso danneggiata da traumi e ustioni; pertanto, rappresenta una comune via d'ingresso per microbi e sostanze estranee ed è sede di risposte immunitarie.

FIGURA 14-9 Le componenti cellulari del sistema immunitario cutaneo. Le principali componenti cellulari del sistema immunitario cutaneo sono qui illustrate schematicamente e comprendono i cheratinociti, le cellule di Langerhans e i linfociti intraepiteliali, tutti localizzati nell'epidermide, e i linfociti T, le DC e i macrofagi localizzati nel derma.

Risposte immunitarie innate e adattative nella cute

L'epidermide costituisce una barriera fisica all'invasione microbica. L'epidermide è formata da molteplici strati di epitelio squamoso stratificato, costituito quasi interamente da cellule epiteliali specializzate, chiamate cheratinociti. Lo strato basale dei cheratinociti, ancorato alla

membrana basale, è in continua proliferazione e le cellule progenitrici in fase di maturazione si spostano verso l'alto e si differenziano per formare nuovi strati. Nello strato superiore più esterno, detto corneo, le cellule vanno incontro a morte programmata, formando così una barriera impermeabile ricca di cheratina e di lipidi, importante per la protezione contro i microbi e gli agenti fisici e chimici dannosi.

Oltre a svolgere il ruolo di barriera fisica, i cheratinociti rispondono attivamente agli agenti patogeni e a eventuali lesioni con la produzione di peptidi antimicrobici, che uccidono i microbi, e varie citochine che promuovono e regolano le risposte immuni. I peptidi antimicrobici prodotti dai cheratinociti comprendono le defensine, S100, e le catelicidine (vedi Cap. 4). Le citochine secrete dai cheratinociti sono il TNF, la linfopoietina timica stromale (TSLP), l'IL-1, l'IL-6, l'IL-18 e l'IL-33, che promuovono l'infiammazione; il GM-CSF (fattore stimolante le colonie di granulociti e macrofagi; *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) che induce il differenziamento e l'attivazione delle DC nell'epidermide, di cui si parlerà più avanti e l'IL-10 che regola le risposte immunitarie. I cheratinociti producono la chemochina CCL27 che partecipa al reclutamento dei linfociti che esprimono i recettori CCR10. L'attivazione dell'espressione di defensine, citochine e chemochine dipende dai recettori dell'immunità innata espressi dai cheratinociti quali i TLR e gli NLR. I cheratinociti esprimono la maggior parte dei TLR e la proteina NLRP3, responsabile dell'assemblaggio dell'inflammasoma (vedi Cap. 4). Nella cute normale, i cheratinociti sintetizzano in maniera costitutiva la pro-IL-1β e la pro-IL-18. Stimoli come i raggi ultravioletti (UV) attivano l'inflammasoma che processa queste procitochine nella forma attiva, ciò spiega la risposta infiammatoria conseguente all'esposizione alla luce solare. L'attivazione selettiva nei cheratinociti delle vie di trasduzione del segnale associate alla risposta infiammatoria, come il fattore nucleare kB (*Nuclear Factor-κB,* NF-κB) e il fattore di trascrizione STAT3 nei cheratinociti, determina in modelli murini malattie infiammatorie della cute che mostrano come queste cellule giochino un ruolo fondamentale nelle risposte cutanee.

Svariate sottopopolazioni di DC sono normalmente presenti nella cute e contribuiscono sia alle risposte innate sia ad avviare le risposte T nei

confronti degli antigeni microbici e ambientali. Nell'epidermide, le DC più rappresentate sono le cellule di Langerhans, che esprimono un recettore lectinico di tipo C, chiamato langherina (CD207), e hanno numerosi granuli di Birbeck nel citoplasma (vedi Fig. 6-4). I dendriti delle cellule di Langerhans formano una densa rete tra i cheratinociti dell'epidermide. Nel derma, inoltre, sono distribuite in maniera relativamente sparsa sia le DC $CD103^+$, che esprimono la langherina e che appartengono a uno stipite distinto da quello delle cellule di Langerhans, sia cellule langherina-negative, quali le DC plasmacitoidi. Ciascuna di queste popolazioni esprime recettori per i PAMP, espressi dai microrganismi, e per i DAMP (*Damage-Associated Molecular Patterns*; profili molecolari associati al danno) espressi dalle cellule danneggiate. A questi segnali le DC rispondono mediante la secrezione di citochine infiammatorie.

Le DC cutanee catturano gli antigeni proteici, li trasportano ai linfonodi drenanti e presentano i peptidi processati ai linfociti T, o li trasferiscono a altre DC residenti nei linfonodi. Quando le cellule di Langerhans incontrano i microrganismi patogeni, vengono attivate in seguito all'attivazione dei TLR e di altri sensori microbici (vedi Cap. 6); le cellule perdono la loro adesività per l'epidermide, entrano nei vasi linfatici, iniziano a esprimere il recettore CCR7 e migrano verso le aree T dei linfonodi drenanti, in risposta alle chemochine prodotte in quelle sedi. Anche le cellule di Langerhans maturano in cellule in grado di presentare l'antigene. Ciò che rimane ancora poco chiaro è il contributo relativo delle diverse sottopopolazioni di DC della cute nell'avvio delle risposte T. Sono stati sviluppati modelli murini nei quali le DC che esprimono langherina possono essere selettivamente eliminate in particolari condizioni, questi animali mancano di cellule di Langerhans, ma conservano le DC del derma. Utilizzando questo modello sperimentale in un esperimento di ipersensibilità da contatto i ricercatori hanno dimostrato che alcune risposte T a proteine autologhe modificate chimicamente possono avvenire anche in assenza delle cellule di Langerhans. Inoltre, è stato osservato che le risposte T verso alcuni virus, come quelli erpetici, dipendono dalle DC che esprimono langherina e CD103 ma non dalle cellule di Langerhans. Le cellule di Langerhans sembrano essere necessarie per le risposte T_H2 che causano la dermatite atopica (l'ipersensibilità da contatto e la dermatite atopica saranno trattate più avanti). È possibile che il ruolo delle diverse

popolazioni cutanee di DC possa variare in relazione alla dose e al tipo di antigene e probabilmente anche differire tra la specie umana e quella murina.

La cute umana normale contiene molti linfociti T, il 95% dei quali ha il fenotipo di cellula della memoria. La cute umana contiene circa 1 milione di linfociti T/cm^2, che corrisponde a circa 2×10^{10} cellule totali. Circa il 98% di questi linfociti T è presente nel derma e il 2% è costituito da linfociti intraepiteliali. I linfociti T dermici ($CD4^+$ e $CD8^+$) sono prevalentemente localizzati in sede perivascolare e perifollicolare e solitamente esprimono marcatori tipici delle cellule attivate o della memoria. Non è chiaro se queste cellule risiedano permanentemente nella cute o siano semplicemente in transito tra i capillari ematici e linfatici quale riserva di linfociti della memoria. Tutte le principali sottopopolazioni di linfociti T $CD4^+$, T_H1, T_H2, T_H17 e T regolatori, sono presenti nella cute. Come in altri tessuti, i linfociti T_H1 e T_H17 sono importanti rispettivamente per la difesa contro i microrganismi intracellulari ed extracellulari. Le due tipiche citochine T_H17, l'IL-17 e l'IL-22, sono note per la loro capacità di promuovere l'espressione di defensine e catelicidine da parte dei cheratinociti e la proliferazione delle cellule epidermiche. Al contrario, le citochine T_H2 IL-4 e IL-13 sopprimono la produzione delle defensine e delle catelicidine, e possono contribuire alle infezioni che si osservano nelle malattie cutanee caratterizzate da una risposta T_H2. In alcune malattie infiammatorie croniche della cute, anche i linfociti T γδ possono produrre IL-17. I linfociti T dell'epiderma, molti dei quali sono $CD8^+$, esprimono un repertorio di TCR più ristretto rispetto a quelli presenti in altri tessuti. Nel topo (e in altre specie), molti linfociti T intraepidermici esprimono un TCR γδ, dotato di una limitata diversificazione.

I linfociti T della cute esprimono molecole di homing che promuovono la loro estravasazione a livello dermico (Fig. 14-10). La migrazione nella cute dei linfociti T effettori o della memoria dipende dall'espressione di CLA (antigene linfocitario cutaneo; *Cutaneous Lymphocyte Antigen*), costituito da una porzione saccaridica che lega la selectina E presente sulla membrana plasmatica delle cellule endoteliali. Inoltre, anche l'espressione di CCR4, CCR8 e CCR10, che legano rispettivamente le chemochine

CCL17, CCL1 e CCL27, è necessaria per la localizzazione dei linfociti T nella cute. La capacità di accasarsi nella cute è conferita ai linfociti T durante la loro attivazione a livello dei linfonodi che drenano la cute, mediante un processo di imprinting analogo a quello che avviene nei linfociti T che vengono attivati nei linfonodi mesenterici che drenano le regioni intestinali. Quando i linfociti T naïve riconoscono gli antigeni presentati dalle DC nei linfonodi che drenano la cute, essi ricevono dalle DC segnali che non solo inducono la loro proliferazione e differenziamento in cellule effettrici, ma promuovono anche l'espressione di molecole di homing cutaneo, quali CLA, CCR4, CCR8 e CCR10. È interessante notare che la luce solare e la vitamina D sembrano giocare un ruolo importante nella migrazione dei linfociti T nella cute, analogo a quello della vitamina A e del suo metabolita, l'acido retinoico, nella migrazione linfocitaria nell'intestino. I raggi UVB solari agiscono sul 7-deidricolesterolo prodotto negli strati basali dell'epidermide convertendolo in previtamina D_3. Le DC del derma esprimono l'idrolasi della vitamina D_3 che converte la previtamina D_3 nella forma attiva, $1,25(OH)_2D_3$ che può essere trasportata in forma libera o dalle DC che stanno migrando nei linfonodi che drenano la cute. A livello linfonodale, la $1,25(OH)_2D_3$ attiva specifici recettori nucleari nei linfociti T naïve inducendo la trascrizione di CCR10. Anche l'IL-12 prodotta dalle DC partecipa all'espressione di CLA. È interessante notare che il processo di attivazione dei linfociti T nei linfonodi che drenano la cute determina anche l'espressione di CCR4 e CCR8, mentre, attraverso segnali non ancora noti, causa l'inibizione dell'espressione dell'integrina $\alpha_4\beta_7$, responsabile dell'homing nell'intestino. Così, i linfociti T naïve che vengono attivati nei linfonodi drenanti la cute si differenzieranno in linfociti T effettori, che preferenzialmente torneranno nella cute. La $1,25(OH)_2D_3$ prodotta nel derma può anche agire localmente sui linfociti T effettori e della memoria, aumentando l'espressione di CCR10 e promuovendo la migrazione dei linfociti T nell'epidermide dove i cheratinociti producono CCL27, il ligando di CCR10.

FIGURA 14-10 Caratteristiche di homing dei linfociti cutanei. Le proprietà di homing nella cute dei linfociti effettori sono impresse nei linfonodi che drenano la cute, dove essi vanno incontro al differenziamento

a partire dai precursori naïve. I raggi ultravioletti della luce solare (UVB) stimolano la produzione di vitamina D, che promuove l'espressione di CCR10. IL-12 promuove l'espressione dell'antigene linfocitario cutaneo (CLA) che lega la selectina E, mentre altri segnali promuovono l'espressione di CCR4, CCR8 e CCR10. Queste molecole sono responsabili dell'accasamento dei linfociti T effettori nella cute.

Malattie correlate alle risposte immunitarie nella cute

Diverse malattie infiammatorie della cute sono causate da risposte immunitarie alterate o dirette verso bersagli inappropriati; esamineremo qui due esempi di tali patologie. Oltre a queste malattie infiammatorie, vanno menzionati diversi linfomi maligni a localizzazione cutanea, molti dei quali derivano da linfociti T dotati delle molecole di homing cutaneo.

La psoriasi è un disordine infiammatorio cronico della cute, caratterizzato da placche squamose eritematose, dovute ad alterate risposte dell'immunità innata e adattativa, causate da stimoli ambientali. È noto che la psoriasi insorge quando eventi traumatici o infezioni innescano la produzione, da parte dei cheratinociti, della catelicidina LL-37, che forma dei complessi con il DNA dell'ospite e attiva le DC plasmacitoidi della cute tramite il TLR9. Le DC plasmacitoidi attivate sono in grado di produrre grandi quantità di IFN-α e la cute psoriasica ha una forte "impronta molecolare" legata all'azione dell'IFN di tipo I (per esempio l'espressione di geni inducibili dall'interferone). Uno degli effetti dell'IFN-α consiste nell'attivazione di altre DC che migrano ai linfonodi, attivano i linfociti T helper specifici per antigeni non ancora noti e inducono il loro differenziamento in cellule effettrici in grado di localizzarsi nella cute. Questi linfociti T ricircolano nel derma e promuovono ulteriormente la cascata infiammatoria e la proliferazione persistente dei cheratinociti. I linfociti T_H1 e T_H17 sembrano essere enrambi coinvolti in questa fase della malattia. Studi clinici condotti con gli antagonisti di IL-17 hanno dimostrato un'efficacia simile agli inibitori del TNF nel trattamento della psoriasi. Una delle domande ancora irrisolte in merito a questa patologia è l'identità degli antigeni riconosciuti dai linfociti T.

La dermatite atopica è una malattia infiammatoria cronica della cute caratterizzata da eruzioni cutanee pruriginose, caratterizzata da una risposta T_H2 verso antigeni ambientali in individui geneticamente predisposti. Si è visto che la dermatite atopica si sviluppa in presenza di difetti funzionali della barriera epidermica. Il conseguente aumento dell'ingresso di antigeni normalmente innocui a livello cutaneo accentua le risposte di tipo T_H2. Mutazioni in una proteina coinvolta nel differenziamento dei cheratinociti e nella loro funzione barriera, la filaggrina, sono spesso associate alla dermatite atopica. Inoltre, le risposte T_H2 stimolano la produzione da parte dei linfociti B di IgE specifiche per gli antigeni ambientali che provocano l'attivazione dei mastociti (vedi Cap. 20), un processo che contribuisce alle manifestazioni cliniche della malattia.

TESSUTI IMMUNOLOGICAMENTE PRIVILEGIATI

Le risposte immunitarie e l'infiammazione a esse associate in alcuni distretti dell'organismo, come il cervello, l'occhio, il testicolo, la placenta e il feto, possono portare a grave rischio di danno d'organo o a problemi riproduttivi. Questi tessuti, che si sono evoluti per essere protetti, in misura variabile, dalle risposte immunitarie, sono chiamati **siti immunologicamente privilegiati**. L'immunologo Peter Medawar, coniò il termine *privilegio immunologico* nel 1940 per descrivere, in modelli sperimentali animali, l'assenza di risposte immunitarie nei confronti di tessuti trapiantati nel cervello o nella camera anteriore dell'occhio. Gli antigeni normalmente in grado di evocare risposte immunitarie sono tollerati in questi siti immunologicamente privilegiati. I meccanismi responsabili del privilegio immunologico variano da tessuto a tessuto e non sono del tutto compresi. Alcuni di questi sono simili ai meccanismi di regolazione (precedentemente discussi) presenti nell'intestino e nella cute e ai meccanismi della tolleranza di cui si parlerà nel Capitolo 15. Nei paragrafi che seguono, saranno analizzate alcune caratteristiche peculiari del privilegio immunologico di alcuni tessuti.

Privilegio immunologico dell'occhio, del cervello e del testicolo

Occhio

La visione, che è essenziale per la sopravvivenza della maggior parte dei mammiferi, può essere facilmente compromessa da processi infiammatori che si possono instaurare all'interno dell'occhio. Nella camera anteriore dell'occhio, che è lo spazio pieno di liquido posto tra la cornea, trasparente, davanti all'iride e il cristallino sono presenti speciali meccanismi che riducono al minimo la possibilità che si instaurino risposte immunitarie e infiammatorie. Un'infiammazione in questa sede potrebbe portare all'opacizzazione della cornea e del cristallino, con conseguente perdita della vista. Almeno alcune delle caratteristiche di questa situazione di privilegio immunologico si applicano anche ad altri siti dell'occhio, come la cavità vitrea e lo spazio sottoretinico. Le caratteristiche anatomiche della camera anteriore che contribuiscono al privilegio immunologico si basano sulle strette giunzioni dell'endotelio dei vasi sanguigni presenti nei tessuti adiacenti alla camera anteriore (la cosiddetta barriera ematoculare) che li rende molto poco permeabi, la natura avascolare della cornea e l'assenza di drenaggio linfatico nella camera anteriore, che limita l'esposizione del sistema immunitario adattativo agli antigeni oculari. L'umore acqueo che riempie la camera anteriore contiene diversi fattori dotati di proprietà immunosoppressive/antinfiammatorie, come i neuropeptidi (l'ormone α-melanocito-stimolante, il peptide intestinale vasoattivo e la somatostatina), il TGF-β e l'indolamina 2,3-diossigenasi. Le cellule che rivestono la camera anteriore, le cellule epiteliali dell'iride e l'endotelio esprimono in modo costitutivo il ligando di Fas e il ligando del recettore PD-1 (PD-L1), che possono provocare rispettivamente la morte o l'inattivazione dei linfociti T.

La "deviazione immunologica" presente nella camera anteriore è il fenomeno per cui l'introduzione nella parte anteriore dell'occhio di antigeni proteici provoca una condizione di tolleranza sistemica verso quell'antigene. Questo fenomeno riduce le possibilità che vengano attivate risposte immunitarie adattative verso gli antigeni che penetrano nell'occhio. La tolleranza è misurabile come ridotta risposta infiammatoria, cellulare o anticorpale, verso un antigene introdotto in siti extraoculari, rispetto a quella che si osserva in individui che non avevano precedentemente ricevuto l'antigene a livello intraoculare. La deviazione

immunologica associata alla camera anteriore potrebbe essere dovuta all'azione dei linfociti T regolatori. Studi condotti nel topo mostrano che un antigene introdotto nella camera anteriore viene trasportato dai macrofagi o dalle DC, attraverso il sangue, alla milza e presentato dai linfociti B splenici ai linfociti T naïve con la conseguente generazione di linfociti T regolatori specifici per quell'antigene.

In contrasto con la tolleranza verso gli antigeni introdotti nella camera anteriore, gli antigeni self dell'occhio sono isolati dal sistema immunitario e non sono oggetto di tolleranza sistemica. La mancanza di tolleranza verso gli antigeni autologhi diventa problematica solo in occasione di traumi che espongano gli antigeni dell'occhio al sistema immunitario. Un esempio lampante di questo è l'oftalmia simpatetica, in cui il trauma a un occhio causa il rilascio di antigeni oculari che portano all'insorgenza di una malattia autoimmune sia nell'occhio ferito sia in quello illeso. Presumibilmente, anche se gli antigeni autologhi sono normalmente inaccessibili al sistema immunitario extraoculare per indurre tolleranza, le cellule effettrici attivate e gli anticorpi generati in periferia possono accedere e danneggiare l'occhio ferito.

Cervello

L'infiammazione nel cervello può portare allo squilibrio funzionale e alla morte dei neuroni, con conseguenze disastrose. Il cervello ha caratteristiche anatomiche che impediscono l'attivazione delle risposte adattative, quali l'assenza del drenaggio linfatico e la quasi assenza di DC. L'accesso delle cellule del sistema immunitario e dei mediatori infiammatori al cervello è limitato dalla natura delle giunzioni delle cellule dell'endotelio microvascolare (la cosiddetta barriera ematoencefalica). Alcuni dei meccanismi che operano nell'occhio si possono applicare anche al cervello e tra questi vi è l'azione dei neuropeptidi. Il cervello è ricco di macrofagi residenti, chiamati microglia, che si attivano in risposta al danno tissutale o alle infezioni. La soglia per la loro attivazione è tuttavia superiore a quella dei macrofagi presenti in altri tessuti. Un possibile meccanismo responsabile di questa condizione è rappresentato dal segnale inibitorio generato da CD200, un recettore della microglia. CD200 è espresso in

quantità elevate dai neuroni e da altri tipi cellulari presenti nel cervello ed è responsabile di legami omotipici.

Contrariamente alle osservazioni iniziali, oggi si ritiene che il sistema nervoso centrale sia dotato di sorveglianza immunologica nei confronti delle infezioni microbiche. Per esempio, la frequenza di alcune infezioni opportunistiche del cervello aumenta notevolmente nei pazienti immunodepressi. I pazienti trattati con alcuni anticorpi monoclonali che bloccano l'adesione dei linfociti e dei monociti alle cellule endoteliali presentano un rischio significativamente aumentato, anche se limitato, di attivazione del virus latente JC, responsabile di una malattia fatale del sistema nervoso centrale, denominata leucoencefalopatia multifocale progressiva. Queste osservazioni suggeriscono che il reclutamento dei linfociti T e dei monociti a livello del sistema nervoso centrale sia necessario per mantenere sotto controllo i virus latenti e dimostrano che il cervello non è un sito rigorosamente privilegiato dal punto di vista immunologico.

Testicolo

Il privilegio immunitario del testicolo serve a limitare l'infiammazione che può compromettere la fertilità maschile. Molti antigeni del testicolo adulto vengono espressi solo al momento della pubertà, dunque successivamente allo sviluppo di un sistema immunitario competente che può quindi contenere i precursori di linfociti T e B specifici per gli antigeni testicolari; pertanto, il privilegio immunologico del testicolo svolge anche la funzione di prevenire le risposte autoreattive. Il testicolo, come l'occhio e il cervello, ha una barriera cellulare che limita la diffusione di cellule e molecole ai siti della spermatogenesi. Questa barriera non è formata da cellule endoteliali ma dalle cellule di Sertoli che rivestono lo strato esterno dei tubuli seminiferi in cui avviene la spermatogenesi. L'ambiente ormonale del testicolo, che è ricco di androgeni, esercita un'azione antinfiammatoria sui macrofagi. Il TGF-β è prodotto dalle cellule di Leydig, da quelle di Sertoli e dalle cellule peritubulari e probabilmente contribuisce all'inibizione della risposta immunitaria locale.

Privilegio immunologico del feto nei mammiferi

Il feto esprime geni ereditati dal padre che sono allogenici per la madre, ma normalmente i feti non vengono rigettati dalla madre. In sostanza, il feto è un trapianto naturale che risulta protetto dal rigetto. (Il rigetto dei trapianti allogenici è trattato nel Cap. 17.) La madre è esposta agli antigeni fetali durante la gravidanza, e infatti sono facilmente individuabili anticorpi materni contro molecole MHC di origine paterna. Ovviamente, vi è stata una forte pressione selettiva che ha portato all'evoluzione di meccanismi che proteggono il feto dal sistema immunitario materno, ma questi meccanismi sono ancora poco conosciuti. A questo fenomeno è probabile che contribuiscano molteplici caratteristiche di tipo molecolare e di barriera della placenta, oltre a uno stato di immunosoppressione locale.

Diverse osservazioni sperimentali indicano che la localizzazione anatomica del feto rappresenta un fattore critico per l'assenza di rigetto. Per esempio, dati sperimentali ottenuti in modelli animali mostrano che durante la gravidanza, la madre è in grado di riconoscere e rigettare allotrapianti singenici al feto localizzati in siti extrauterini senza compromettere la sopravvivenza del feto. Blastocisti fetali interamente allogeniche che mancano dei geni materni possono svilupparsi con successo in una donna gravida o pseudogravida. Quindi, per la sopravvivenza del feto non sono necessari specifici geni né materni né paterni. L'immunizzazione della madre con cellule che esprimono gli antigeni paterni non compromette la crescita della placenta e del feto.

Lo studio del fenomeno del mancato rigetto del feto ha focalizzato l'attenzione sulle regioni di contatto tra madre e feto. I tessuti fetali della placenta che più intimamente sono in contatto con la madre sono composti sia da trofoblasti vascolari, che sono esposti al sangue materno e sono responsabili dello scambio di nutrienti; sia dai trofoblasti al sito d'impianto, che infiltrano diffusamente la mucosa uterina (decidua) al fine di ancorare la placenta alla madre.

Una semplice spiegazione è che i trofoblasti non esprimano molecole MHC paterne, inoltre sul trofoblasto non sono state individuate molecole MHC di classe II. Nel topo, le cellule del trofoblasto impiantato, ma non del trofoblasto vascolare, esprimono molecole MHC di classe I di origine paterna. Nell'uomo, la situazione potrebbe essere più complessa, in quanto

le cellule del trofoblasto esprimono solo un tipo di molecole MHC di classe IB non polimorfa, chiamata HLA-G. Questa molecola potrebbe essere coinvolta nella protezione delle cellule del trofoblasto dall'uccisione da parte delle cellule NK materne. Una popolazione specializzata di cellule NK, le cellule NK uterine, rappresenta il principale tipo di linfociti presenti nei siti d'impianto e la produzione dell'IFN-γ da parte di queste cellule è fondamentale per lo sviluppo della decidua. Il modo in cui le cellule NK uterine sono stimolate e il loro ruolo nelle risposte materne verso gli alloantigeni fetali non sono noti. Anche se le cellule del trofoblasto esprimono molecole MHC classiche, esse sono prive di molecole costimolatorie e non riescono a svolgere la funzione di cellule che presentano l'antigene.

È possibile che la decidua uterina sia un sito dove le risposte immunitarie sono funzionalmente inibite. A sostegno di questa idea vi è l'osservazione che la decidua murina è altamente sensibile alle infezioni da *Listeria monocytogenes* e in questo tessuto non possono avere luogo risposte di ipersensibilità ritardata. La ragione di questo privilegio immunologico non può essere quella di semplice barriera anatomica, perché il sangue materno è ampiamente in contatto con il trofoblasto; piuttosto, è probabile che si tratti di una barriera funzionale, attribuibile a molteplici meccanismi.

La tolleranza materna del feto potrebbe essere dovuta ai linfociti Treg. Osservazioni sperimentali suggeriscono che i linfociti T regolatori siano in grado di prevenire reazioni immunitarie contro antigeni di derivazione paterna che non sono espressi nella madre. In modelli murini, gli antigeni fetali promuovono la generazione di linfociti Treg $FoxP3^+$ a lunga sopravvivenza e l'eliminazione di queste cellule provoca la perdita del feto. Durante la gravidanza, i linfociti Treg sistemici, presenti nella decidua, aumentano nella madre, e una elevata quantità di Treg è stata osservata anche nel feto. Di fatto, i mammiferi euteri (mammiferi con placenta) hanno sviluppato un cambiamento mediato dai trasposoni in una sequenza regolatoria del gene *FoxP3* che consente loro di generare Treg periferici. Questa regione regolatoria di *FoxP3* non si trova nei vertebrati meno evoluti o nei mammiferi metateri come i canguri e i marsupiali che trasportano i loro piccoli con sé. Lo studio del ruolo dei linfociti Treg nella

gravidanza umana rappresenta un'attiva area di ricerca, così come l'ipotesi che difetti dei Treg siano coinvolti negli aborti spontanei ricorrenti.

La risposta verso il feto potrebbe essere regolata dalle concentrazioni locali del triptofano e dei suoi metaboliti nella decidua. L'enzima indolamina 2,3-diossigenasi (IDO) catabolizza il triptofano, e il farmaco 1-methyltryptophan, che inibisce IDO provoca l'aborto attraverso un meccanismo T-dipendente. Queste osservazioni hanno condotto all'ipotesi che le risposte T nei confronti del feto possano essere normalmente bloccate perché i livelli di triptofano nella decidua sono mantenuti bassi o perché i livelli dei metaboliti tossici prodotti da IDO sono alti.

Molti altri meccanismi possono essere coinvolti nell'inibizione della risposta della madre verso il feto; tra questi, l'espressione del ligando di Fas da parte delle cellule trofoblastiche fetali che provocano l'apoptosi dei linfociti materni attivati che esprimono Fas, la generazione di DC tollerogeniche in risposta alle cellule della decidua che esprimono galectin-1 e l'alterata migrazione delle DC dall'utero verso i linfonodi.

Il trofoblasto e la decidua sono anche risultati resistenti al danno mediato dal complemento. Nel topo questi tessuti esprimono un inibitore delle frazioni C3 e C4, chiamato Crry. Gli embrioni che sono difettivi per Crry muoiono prima della nascita in seguito all'attivazione del complemento sulle cellule del trofoblasto. Pertanto, questo inibitore può bloccare il danno causato dagli alloanticorpi e dal complemento; tuttavia, l'inibitore Crry o molecole a esso equivalenti non sono stati ancora identificati nell'uomo.

RIEPILOGO

- * I sistemi immunitari regionali, quali quelli del tratto gastroenterico e della cute, sono aggregati altamente specializzati di cellule e tessuti dell'immunità innata e adattativa che si trovano in particolari localizzazioni anatomiche, dove svolgono funzioni protettive e regolatrici uniche per quei siti.
- * Il sistema immunitario gastrointestinale deve fronteggiare la presenza di miliardi di batteri commensali nel lume dell'intestino cercando di prevenirne l'invasione e tollerando la loro presenza. Allo

stesso tempo cerca di identificare e di rispondere ai saltuari organismi patogeni che si possono presentare.

- * L’immunità nel sistema gastrointestinale è dovuta alle cellule epiteliali, che delimitano la mucosa e impediscono l’invasione microbica mediante giunzioni serrate, alla secrezione di muco e alla produzione di molecole antimicrobiche, come le defensine. Le cellule effettrici dell’immunità innata presenti nella lamina propria includono i macrofagi, le DC e i mastociti. I linfociti intraepiteliali, compresi i linfociti T γδ, provvedono alla difesa contro i microbi comunemente incontrati a livello della barriera epiteliale intestinale.
- * Il sistema immunitario adattativo del tratto gastrointestinale comprende aggregati subepiteliali di tessuto linfoide detti tessuti linfoidi associati all’intestino (*Gut-Associated Lymphoid Tissues*, GALT), come le tonsille orofaringee, le placche di Peyer nell’ileo e formazioni simili nel colon. Le cellule M nello strato epiteliale catturano gli antigeni del lume e li trasportano alle cellule che presentano l’antigene nel GALT. Le DC della lamina propria estendono le loro protrusioni citoplasmatiche attraverso le cellule epiteliali che delimitano l’intestino per catturate gli antigeni luminali. Ci sono anche linfociti effettori sparsi nella lamina propria dell’intestino e nei linfonodi mesenterici.
- * I linfociti B e T effettori che si differenziano dai linfociti naïve nel GALT o nei linfonodi mesenterici entrano in circolo e selettivamente tornano alla lamina propria intestinale.
- * L’immunità umorale nel tratto gastrointestinale è caratterizzata dalla secrezione nel lume di IgA che neutralizzano i patogeni potenzialmente invasivi. I linfociti B nel GALT e nei linfonodi mesenterici si differenziano in plasmacellule che secernono le IgA ai attraverso meccanismi T-dipendenti sia T-indipendenti. Le plasmacellule migrano nella lamina propria al di sotto della barriera epiteliale dove secernono le IgA. Le IgA dimeriche sono trasportate attraverso l’epitelio dal recettore per poli-Ig e rilasciate nel lume. Le IgA sono secrete anche nel latte materno e sono responsabili dell’immunità passiva nell’intestino dei neonati allattati al seno.
- * I linfociti T_H17 nel tratto intestinale, secernono IL-17 e IL-22, che aumentano le funzioni di barriera dell’epitelio. I linfociti T_H2 sono invece importanti per la difesa contro i parassiti intestinali. I

cambiamenti nella flora batterica influenzano l’equilibrio delle risposte tra le diverse sottopopolazioni di linfociti T helper, sia nell’intestino sia a livello sistemico.

- * Le risposte immunitarie verso gli organismi commensali e gli antigeni alimentari presenti nel lume del tratto intestinale risultano minimizzate dalla selettiva espressione di PRR nel citoplasma e nelle superfici basolaterali delle cellule epiteliali, e dalla presenza di linfociti T regolatori che sopprimono le risposte adattative. TGF-β, IL-10 e IL-2 sono essenziali per mantenere l’omeostasi immunitaria a livello della parete intestinale. La tolleranza sistemica verso alcuni antigeni può essere sperimentalmente generata attraverso la somministrazione di antigeni insieme al cibo, un fenomeno chiamato tolleranza orale.
- * Diverse malattie intestinali sono correlate ad abnormi risposte immunitarie, tra cui le malattie infiammatorie dell’intestino (morbo di Crohn e colite ulcerosa), nelle quali le risposte innate e adattative verso la flora batterica intestinale non sono adeguatamente regolate e la malattia celiaca, caratterizzata da risposte umorali e cellulari nei confronti del glutine assunto con la dieta.
- * L’immunità mucosale del sistema respiratorio offre una difesa contro i patogeni presenti nell’aria ed è causa di malattie respiratorie allergiche, come l’asma. Nell’albero bronchiale, l’immunità innata dipende dallo strato epiteliale ciliato, che è in grado di spingere il muco prodotto, contenente i microbi intrappolati, all’esterno dei polmoni. Le defensine e i surfattanti, nonché i macrofagi alveolari, assolvono a funzioni sia antimicrobiche sia antinfiammatorie. I Treg e le citochine immunosoppressive sono importanti per la prevenzione di risposte dannose nei confronti di microrganismi non patogeni e antigeni inalati.
- * Il sistema immunitario cutaneo costituisce una difesa contro l’invasione microbica attraverso la cute e sopprime le risposte verso numerosi organismi commensali. Lo strato epiteliale squamoso pluristratificato, chiamato epidermide, svolge funzioni di difesa dell’immunità innata provvedendo alla formazione di una barriera fisica contro le invasioni microbiche. I cheratinociti secernono le defensine e citochine infiammatorie in risposta a prodotti microbici. Il

derma contiene una popolazione mista di mastociti e DC che risponde ai microbi e ai traumi generando risposte infiammatorie.

- * Le cellule dendritiche cutanee sono responsabili dell'immunità innata e del trasporto ai linfonodi drenanti dei microrganismi e degli antigeni ambientali che penetrano attraverso la cute, dove vengono avviate le risposte T. I linfociti T attivati nei linfonodi che drenano il distretto cutaneo esprimono i recettori per le chemochine e le molecole di adesione che favoriscono l'homing nella cute.
- * I linfociti $CD4^+$ o $CD8^+$ effettori o della memoria sono presenti nel derma. I linfociti T_H1, T_H2, e T_H17 sono importanti per la difesa contro diversi tipi di patogeni che invadono la cute, ma possono anche contribuire all'insorgenza di dermatosi infiammatorie come la psoriasi (linfociti T_H1 e T_H17) e alla dermatite atopica (linfociti T_H2).
- * I siti immunologicamente privilegiati, che sono i tessuti in cui le risposte immunitarie non hanno luogo, sono il cervello, la camera anteriore dell'occhio e il testicolo. I meccanismi responsabili del privilegio immunologico comprendono giunzioni serrate tra le cellule dell'endotelio ematico locale, citochine immunosoppressive e molecole di membrana che inattivano o uccidono i linfociti.
- * Nei mammiferi, la tolleranza immunologica materna nei confronti del feto che esprime antigeni paterni allogenici, dipende da meccanismi che agiscono a livello dell'interfaccia placentare materno-fetale. I possibili meccanismi coinvolti includono la mancanza di espressione di molecole MHC sul trofoblasto fetale, l'azione dei linfociti T regolatori e la degradazione di triptofano a opera dalla indolamina 2,3-diossigenasi locale, necessaria per lo sviluppo dei linfociti.

LETTURE CONSIGLIATE

Immunità mucosale, in generale

Brandtzaeg P: Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scandinavian Journal of Immunology* 70:505–515 (2009).

Doss M.; White M.R.; Tecle T.; Hartshorn K.L: Human defensins and LL-37 in mucosal immunity. *Journal of Leukocyte Biology* 87:79–92 (2010).

Dubin P.J.; Kolls J.K: Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunological Reviews* 226:160–171 (2008).

Sheridan B.S.; Lefrancois L: Regional and mucosal memory T cells. *Nature immunology* 12:485–491 (2011).

Sistema imunitario gastrointestinale, in generale

Abreu M.T: Toll-like receptor signaling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature Reviews Immunology* 10:131–144 (2010).

Barnes M.J.; Powrie F: Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity* 31:401–411 (2009).

Brestoff J.R.; Artis D: Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nature Immunology* 14:676–684 (2013).

Brown E.M.; Sadarangani M.; Finlay B.B: The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nature Immunology* 14:660–667 (2013).

Dommett R.; Zilbauer M.; George J.T.; Bajaj-Elliott M: Innate immune defense in the human gastrointestinal tract. Molecular Immunology 42:903–912 (2005).

Duerkop B.A.; Vaishnava S.; Hooper L.V: Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity* 31:368–376 (2009).

Eberl G.; Lochner M: The development of intestinal lymphoid tissues at the interface of self and microbiota. *Mucosal Immunology* 2:478–485 (2009).

Hooper L.V.; Macpherson A.J: Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology*

10:159–169 (2010).

Johansson-Lindbom B.; Agace W.W: Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunological Reviews* 215:226–242 (2007).

Maynard C.L.; Elson C.O.; Hatton R.D.; Weaver C.T: Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 489:231–241 (2012).

Maynard C.L.; Weaver C.T: Intestinal effector T cells in health and disease. *Immunity* 31:389–400 (2009).

Rescigno M.; Di Sabatino A: Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *The Journal of Clinical Investigation* 119:2441–2450 (2009).

Varol C.; Zigmond E.; Jung S: Securing the immune tightrope: mononuclear phagocytes in the intestinal lamina propria. *Nature Reviews Immunology* 10:415–426 (2010).

Risposte dell’immunità innata nel sistema immunitario gastrointestinale

Cerutti A.; Rescigno M: The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* 28:740–750 (2008).

Fagarasan S.; Kawamoto S.; Kanagawa O.; Suzuki K: Adaptive immune regulation in the gut: T cell–dependent and T cell–independent IgA synthesis. *Annual Review of Immunology* 28:243–273 (2010).

Macpherson A.J.; McCoy K.D.; Johansen F.E.; Brandtzaeg P: The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunology* 1:11–22 (2008).

Mora J.R.; von Andrian U.H: Differentiation and homing of IgA-secreting cells. *Mucosal Immunology* 1:96–109 (2008).

Mora J.R.; von Andrian U.H: Differentiation and homing of IgA-secreting cells. *Mucosal Immunology* 1:96–109 (2008).

Immunità mucosale nel sistema respiratorio

Chen K.; Kolls J.K: T cell-mediated host immune defenses in the lung. *Annual Review of Immunology* 31:605–633 (2013).

Holt P.G.; Strickland D.H.; Wikstrom M.E.; Jahnsen F.L: Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nature Reviews Immunology* 8:142–152 (2008).

Lambrecht B.N.; Hammad H: Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology. *Annual Reviews of Immunology* 30:243–270 (2012).

Wissinger E.; Goulding J.; Hussell T: Immune homeostasis in the respiratory tract and its impact on heterologous infection. *Seminars in Immunology* 21:147–155 (2009).

Sistema immunitario cutaneo

Clark R.A: Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. *Journal of Investigative Dermatology* 130:362–370 (2010).

DiMeglio P.; Perera G.K.; Nestle F.O: The multitasking organ: recent insights into skin immune function. *Immunity* 35:857–870 (2011).

Heath W.R.; Carbone F.R: The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nature Immunology* 14:978–985 (2013).

Jabri B.; Sollid L.M: Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nature Reviews Immunology* 9:858–870 (2009).

Kaser A.; Zeissig S.; Blumberg R.S: Inflammatory bowel disease. *Annual Review of Immunology* 28:573–621 (2010).

Kaplan D.H.; Igyártó B.Z.; Gaspari A.A: Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nature Reviews Immunology* 12:570–580 (2012).

Khor B.; Gardet A.; Xavier R.J: Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474:307–317 (2011).

Metz M.; Maurer M: Innate immunity and allergy in the skin. *Current Opinion in Immunology* 21:687–693 (2009).

Nestle F.O.; Di Meglio P.; Qin J.Z.; Nickoloff B.J: Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 9:679–691 (2009).

Romani N.; Clausen B.E.; Stoitzner P: Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunological Reviews* 234:120–141 (2010).

Weaver C.T.; Elson C.O.; Fouser L.A.; Kolls J.K: The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. *Annual Review of Pathology* 24:477–512 (2013).

Altri sistemi immunitari specializzati

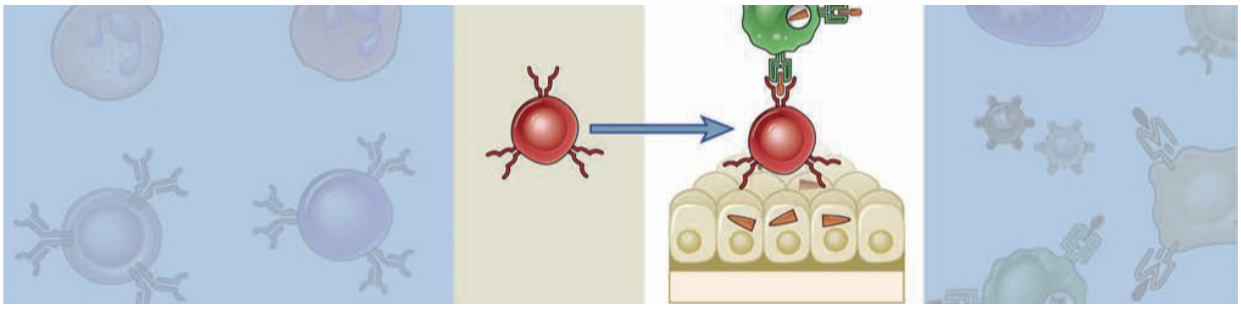
Erlebacher A: Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus. Nature Reviews Immunology 13:23–33 (2013).

Streilein J.W: Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 74:179–185 (2003).

von Rango U: Fetal tolerance in human pregnancy–a crucial balance between acceptance and limitation of trophoblast invasion. *Immunology Letters* 115:21–32 (2008).

CAPITOLO

15



Tolleranza immunologica e autoimmunità

CARATTERISTICHE GENERALI DELLA TOLLERANZA IMMUNOLOGICA

TOLLERANZA DEI LINFOCITI T

- Tolleranza centrale dei linfociti T
- Tolleranza periferica dei linfociti T
- Fattori che determinano la tolleranza degli antigeni self

TOLLERANZA DEI LINFOCITI B

- Tolleranza centrale dei linfociti B
- Tolleranza periferica dei linfociti B

TOLLERANZA VERSO GLI ANTIGENI PROTEICI NON SELF

MECCANISMI CHE REGOLANO L'AUTOIMMUNITÀ

- Caratteristiche generali delle malattie autoimmuni
- Anomalie immunologiche che determinano autoimmunità
- Fattori genetici nell'autoimmunità
- Ruolo delle infezioni nell'autoimmunità
- Altri fattori che regolano le risposte autoimmuni

RIEPILOGO

Si definisce tolleranza immunologica la mancata responsività a un antigene causata da una precedente esposizione a quello stesso antigene. Il termine nasce dall'osservazione sperimentale secondo cui gli animali che erano entrati in contatto con un antigene in determinate condizioni non avrebbero risposto, ovvero avrebbero tollerato successive esposizioni allo stesso antigene. Quando i linfociti incontrano l'antigene possono esserne attivati e dare origine a una risposta immunitaria oppure possono esserne inattivati o eliminati e dare luogo alla tolleranza. Forme diverse di uno stesso antigene possono provocare una risposta immunitaria o la tolleranza. Gli antigeni che inducono tolleranza vengono chiamati tollerogeni, oppure antigeni tollerogenici, per distinguerli dagli immunogeni, che generano immunità. Uno stesso antigene può essere un immunogeno o un tollerogeno, se viene riconosciuto da linfociti specifici rispettivamente in presenza o in assenza di infiammazione e di risposte dell'immunità innata. La tolleranza agli antigeni self, detta anche **tolleranza al self**, è una proprietà fondamentale di un sistema immunitario normale. L'assenza di tolleranza al self dà luogo a risposte immunitarie contro gli antigeni self (autologhi); queste reazioni

vengono dette **autoimmuni** e le malattie che esse causano sono definite **malattie autoimmuni**. L'importanza della tolleranza al self per la salute dell'uomo è stata riconosciuta sin dagli esordi dell'immunologia. Nel Capitolo 1, abbiamo introdotto il concetto di discriminazione self-non-self, che rappresenta la capacità del sistema immunitario di riconoscere e rispondere ad antigeni estranei ma non ad antigeni self. Macfarlane Burnet aggiunse alla sua ipotesi sulla selezione clonale il corollario secondo cui i linfociti specifici per gli antigeni self sono eliminati al fine di prevenire reazioni immunitarie contro i tessuti propri dell'organismo. La comprensione dei meccanismi della tolleranza al self è la chiave per comprendere la patogenesi dell'autoimmunità.

In questo capitolo discuteremo della tolleranza immunologica, soprattutto nel contesto della tolleranza al self, e di come questa possa mancare, dando luogo all'autoimmunità. Prenderemo, inoltre, in esame la tolleranza ad antigeni non self e la possibilità di utilizzare la tolleranza come strategia terapeutica per malattie allergiche e autoimmuni e per prevenire il rigetto di trapianti di cellule e organi.

CARATTERISTICHE GENERALI DELLA TOLLERANZA IMMUNOLOGICA

La tolleranza dei linfociti T e B comprende molti aspetti ed è importante esaminarne i principi fondamentali prima di addentrarsi nei meccanismi specifici che caratterizzano la tolleranza di queste popolazioni cellulari.

- ***Gli individui normali sono tolleranti verso i propri antigeni (antigeni self) poiché i linfociti autoreattivi vengono uccisi, inattivati oppure indotti a cambiare la loro specificità.*** Tutti gli individui ereditano essenzialmente gli stessi geni che codificano per i recettori per l'antigene; queste sequenze si ricombinano e sono espresse dai linfociti non appena questi si generano dai loro precursori. La specificità dei recettori deriva dalla ricombinazione casuale che hanno subito i geni per i recettori e non è influenzata da ciò che è self o non self per ciascun individuo (vedi Cap. 8). Non è quindi sorprendente che, durante questo

processo che porta alla generazione di un ampio e variegato repertorio, alcuni linfociti T e B possano esprimere recettori in grado di riconoscere molecole normali che appartengono allo stesso individuo, cioè antigeni self. Quindi, esiste il rischio che questi linfociti, reagendo contro cellule e tessuti dello stesso individuo, possano essere dannosi. I meccanismi della tolleranza immunologica si sono evoluti fino a prevenire questo tipo di reazioni.

- ***La tolleranza è il risultato del riconoscimento degli antigeni da parte di linfociti specifici.*** In altre parole la tolleranza è antigene-specifica. Questo contrasta con l'immunosoppressione terapeutica, che riguarda linfociti con diverse specificità. La scoperta chiave che ha permesso agli immunologi di studiare la tolleranza fu la capacità di indurre questo fenomeno negli animali dopo l'esposizione ad antigeni somministrati in diverse condizioni sperimentali e analizzare successivamente la sopravvivenza e le funzioni dei linfociti che avevano riconosciuto gli antigeni. Negli anni Cinquanta, Peter Medawar e colleghi dimostrarono che topi neonati di un determinato ceppo, che venivano esposti a cellule ottenute da altri ceppi, non rispondevano a successivi trapianti di cute proveniente dal ceppo donatore. Studi successivi dimostrarono che la tolleranza poteva essere generata non solo verso cellule estranee ma anche verso proteine e altri tipi di antigeni.
- ***La tolleranza al self può essere generata nei linfociti autoreattivi immaturi negli organi linfoidi primari (tolleranza centrale) oppure nei linfociti maturi presenti nei siti periferici (tolleranza periferica)*** (Fig. 15-1). La tolleranza centrale determina il fatto che il repertorio dei linfociti maturi diventi incapace di riconoscere gli antigeni self presenti negli organi linfoidi primari (il timo per i linfociti T e il midollo osseo per i linfociti B; questi compartimenti anatomici vengono anche chiamati *organi linfoidi centrali*). La tolleranza centrale non è tuttavia perfetta e alcuni linfociti autoreattivi completano la maturazione. Pertanto, sono necessari meccanismi di tolleranza periferica che prevengano l'attivazione di tali linfociti potenzialmente pericolosi.
- ***La tolleranza centrale si attua durante una precisa fase del processo di maturazione dei linfociti, quando l'incontro con l'antigene può dare luogo a morte cellulare o alla sostituzione di un recettore dell'antigene autoreattivo con uno non autoreattivo.*** Gli organi

linfoidi primari contengono essenzialmente antigeni self perché gli antigeni estranei (per esempio gli antigeni microbici) che provengono dall'ambiente esterno vengono catturati e portati agli organi linfoidi secondari, come i linfonodi, la milza e il tessuto linfoide associato alle mucose. Gli antigeni self presenti negli organi linfoidi primari comprendono gli antigeni ubiquitari o ampiamente espressi, inclusi quelli trasportati dal sangue. Inoltre, alcuni antigeni periferici tessuto-specifici sono espressi nel timo mediante un meccanismo speciale descritto più avanti. Quindi, negli organi linfoidi primari i linfociti immaturi che riconoscono in modo specifico gli antigeni sono generalmente cellule specifiche per gli antigeni self. Il destino dei linfociti immaturi che riconoscono gli antigeni self con elevata affinità è descritto più avanti (vedi Fig. 15-1).

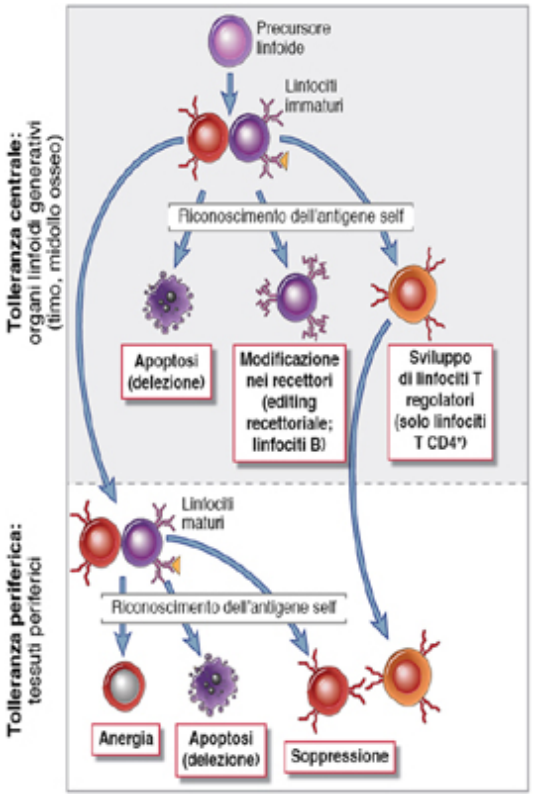


FIGURA 15-1 Tolleranza centrale e periferica agli antigeni self. I linfociti immaturi specifici per gli antigeni self vengono eliminati o spinti a cambiare la loro specificità in seguito al riconoscimento dell'antigene negli organi linfoidi primari (tolleranza centrale). Alcuni linfociti autoreattivi possono maturare e migrare nei tessuti periferici ed essere qui inattivati o eliminati in seguito all'incontro con l'antigene self o essere inibiti dai linfociti T regolatori (tolleranza periferica). È importante ricordare che i linfociti T riconoscono gli antigeni presentati dalle cellule accessorie (non mostrate in figura).

- ***La tolleranza periferica si genera quando i linfociti maturi che riconoscono gli antigeni self muoiono per apoptosi o diventano incapaci di attivarsi anche dopo un ulteriore incontro a tale antigene.*** La tolleranza periferica è un importante meccanismo che mantiene la non responsività verso gli antigeni self espressi nei tessuti periferici, ma non negli organi linfoidi primari, e che determina la tolleranza agli antigeni self espressi solo durante la vita adulta, dopo che linfociti maturi specifici per questi antigeni hanno già avuto la possibilità di essere stati generati. Come affermato in precedenza, i meccanismi di tolleranza periferica possono anche servire da supporto alla tolleranza centrale che potrebbe non riuscire a eliminare tutti i linfociti reattivi verso il self.
- ***La tolleranza periferica è inoltre sostenuta dall'azione dei linfociti T regolatori (Treg) che inibiscono attivamente i linfociti specifici per gli antigeni self.*** Questa inibizione ha luogo negli organi linfoidi secondari e in tessuti non linfoidi.
- ***Alcuni antigeni self sono sequestrati dal sistema immunitario, altri vengono ignorati.*** Gli antigeni possono essere sequestrati dal sistema immunitario per effetto di barriere anatomiche, come all'interno di testicoli e occhi, pertanto non possono essere riconosciuti dai linfociti (vedi Cap. 14). Studi condotti in modelli sperimentali hanno mostrato che in alcune situazioni gli antigeni self pur essendo accessibili al riconoscimento da parte dei linfociti, per motivi sconosciuti, non riescono a scatenare alcuna risposta e vengono ignorati a livello funzionale. L'importanza di questo fenomeno di "ignoranza immunologica" nell'ambito della tolleranza al self non è ancora del tutto compresa.
- ***In assenza di segnali costimolatori, gli antigeni non self possono inibire la risposta immunitaria causando tolleranza.*** Molti dei meccanismi della tolleranza verso gli antigeni non self sono simili a quelli della tolleranza ai self attivi sui linfociti maturi (tolleranza periferica). Alcuni microbi e alcuni tumori possono eludere il sistema immunitario attraverso l'attivazione di una non responsività nei linfociti specifici.
- ***La tolleranza immunologica è stata studiata come approccio terapeutico per prevenire risposte immunitarie dannose.*** Un notevole

sforzo è stato rivolto allo sviluppo di strategie che mirano a generare tolleranza, nell'ambito di terapie per patologie autoimmuni o allergiche e per prevenire il rigetto degli organi trapiantati. L'attivazione della tolleranza potrebbe rivelarsi utile anche nella prevenzione di risposte nei confronti di prodotti di geni di nuova espressione, come quelli utilizzati in protocolli di terapia genica in pazienti affetti da deficit di specifiche proteine (per esempio i pazienti emofilici trattati con il fattore VIII) e per promuovere l'attecchimento del trapianto di cellule staminali.

Approcci sperimentali, che si basano soprattutto sulla creazione di topi knockout e knockin, e l'identificazione dei geni che sono mutati in alcune patologie autoimmuni hanno fornito modelli utili per lo studio della tolleranza al self e molte delle nostre attuali conoscenze si fondano sull'utilizzo di questi approcci sperimentali. Inoltre, attraverso l'identificazione dei geni associati a malattie autoimmuni sperimentali o umane è stato possibile dedurre alcuni dei meccanismi critici della tolleranza al self. Tuttavia, non conosciamo la natura degli antigeni self che inducono tolleranza centrale piuttosto che periferica (o sono ignorati). Inoltre, non sappiamo quali siano i meccanismi di mancata tolleranza responsabili delle più comuni malattie autoimmuni umane; questo dilemma rimane una delle maggiori sfide che devono essere affrontate per comprendere appieno l'autoimmunità.

Nei paragrafi che seguono discuteremo della tolleranza centrale e periferica dapprima nei linfociti T e poi nei B, molti aspetti sono comuni a entrambi i tipi cellulari.

TOLLERANZA DEI LINFOCITI T

La tolleranza nei linfociti T helper $CD4^+$ rappresenta un meccanismo efficace per la prevenzione delle risposte cellulari e umorali agli antigeni proteici, poiché i linfociti T helper sono necessari per entrambi i tipi di risposta. Questa conclusione ha stimolato gli immunologi a sviluppare modelli sperimentali e a condurre studi mirati a chiarire principalmente i meccanismi della tolleranza dei linfociti T $CD4^+$. Inoltre, molte delle

strategie terapeutiche che sono state sviluppate per indurre la tolleranza verso i trapianti e gli autoantigeni sono mirate all'inattivazione o all'eliminazione dei linfociti T. Per questo motivo, la maggior parte della trattazione che segue, specialmente quella sulla tolleranza periferica, verterà sui linfociti T $CD4^+$. Le conoscenze sul contributo alla tolleranza periferica dei linfociti T $CD8^+$ sono minori e questo aspetto verrà riassunto alla fine di questa parte del capitolo.

Tolleranza centrale dei linfociti T

Nel corso della maturazione timica, molti dei linfociti T immaturi che riconoscono l'antigene con elevata affinità vengono eliminati e alcuni linfociti T $CD4^+$ autoreattivi che sopravvivono danno origine a linfociti T regolatori (Fig. 15-2). Il processo di delezione, o selezione negativa, dei linfociti T nel timo è già stato descritto nel Capitolo 8 nell'ambito della trattazione del processo di maturazione dei linfociti T. Il processo di selezione negativa interessa sia le cellule ristrette per classe I sia quelle ristrette per classe II dell'MHC ed è quindi importante per la tolleranza a carico sia dei linfociti T $CD8^+$ sia dei $CD4^+$. La selezione negativa dei timociti è responsabile del fatto che i linfociti T maturi, che abbandonano il timo e popolano i tessuti linfoidi secondari, non sono in grado di rispondere a molti degli antigeni self normalmente presenti in elevate concentrazioni nel timo. I due principali fattori che determinano la selezione negativa dei timociti autoreattivi sono la presenza nel timo dell'antigene stesso, dovuta all'espressione in loco oppure al trasporto dal circolo sanguigno, e l'affinità con cui il recettore dei linfociti T (*T Cell Receptor*, TCR) lo riconosce. Pertanto le domande rilevanti rispetto alla selezione negativa riguardano l'individuazione degli antigeni self presenti nel timo e il modo in cui vengono eliminati i linfociti T immaturi che riconoscono tali antigeni.

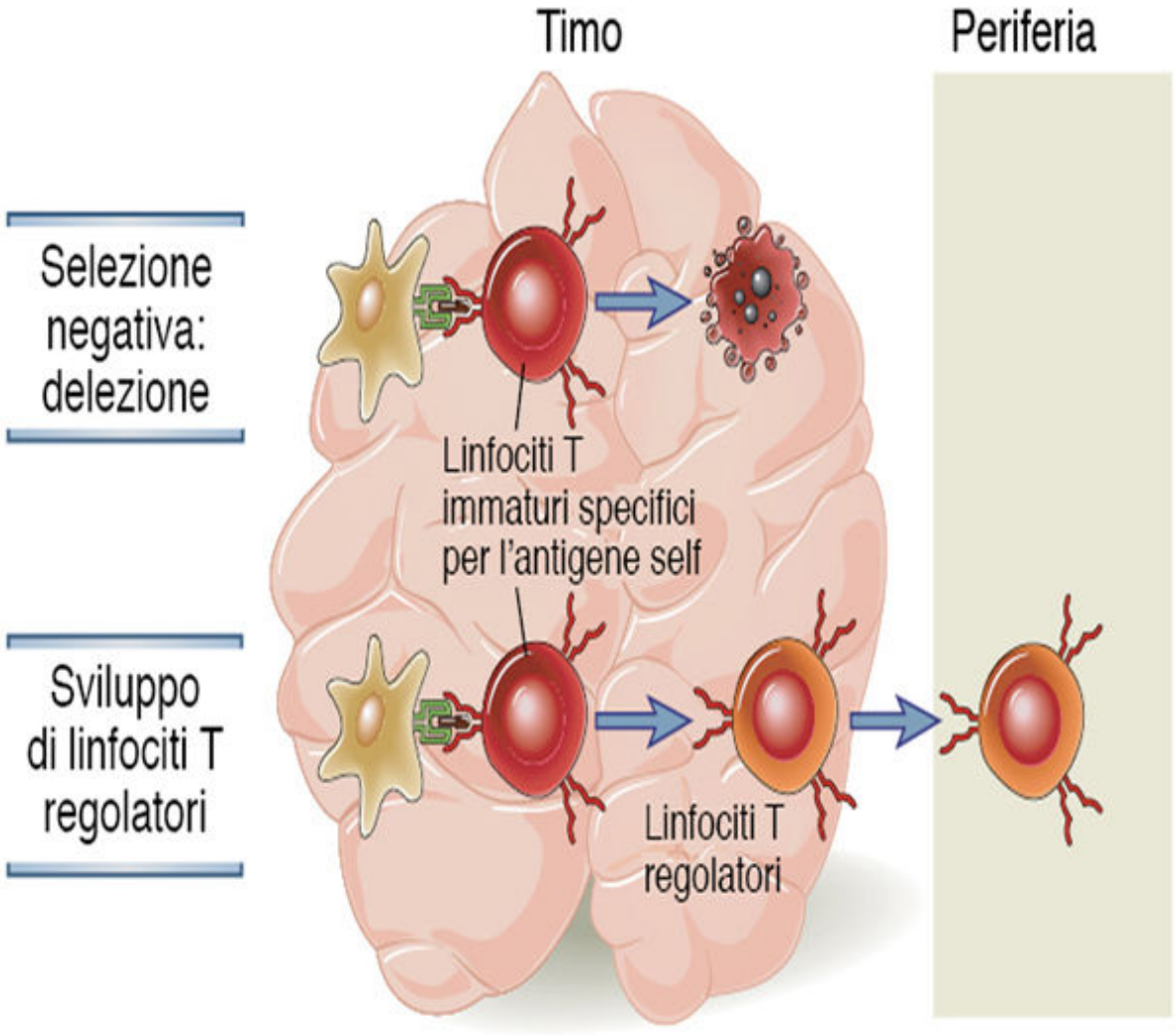


FIGURA 15-2 Tolleranza centrale dei linfociti T. Il riconoscimento degli antigeni self nel timo da parte dei linfociti T immaturi porta alla morte delle cellule (selezione negativa o delezione) o allo sviluppo di linfociti T regolatori che si localizzano nei tessuti periferici.

La selezione negativa coinvolge i linfociti doppio-positivi presenti nella corticale timica e i linfociti T di nuova generazione, singolo-positivi, della midollare. In entrambe queste sedi, i timociti immaturi con recettori ad elevata affinità per antigeni self che incontrano tali antigeni muoiono per apoptosi. Il segnale proveniente dal TCR espresso dalle cellule T immature scatena la via mitocondriale dell'apoptosi. I meccanismi di apoptosi verranno descritti in seguito in questo capitolo, nell'ambito della trattazione della delezione come meccanismo di tolleranza periferica dei linfociti T. Questo significa che i linfociti immaturi e i linfociti maturi interpretano i segnali generati dal recettore per l'antigene in maniera diversa, laddove i

primi muoiono, i secondi vengono invece attivati. Le basi biochimiche di questa differenza non sono note.

Gli antigeni presenti nel timo derivano da numerose proteine presenti nel circolo ematico o associate a cellule, che sono ampiamente distribuite nei tessuti. Il timo, inoltre, ha uno speciale meccanismo di espressione di antigeni proteici che sono tipicamente presenti solo in alcuni tessuti periferici, che permette che i linfociti T immaturi e specifici per questi antigeni possano essere eliminati dal repertorio dei linfociti T in fase di sviluppo. Le cellule epiteliali della midollare timica esprimono, sotto il controllo del gene **AIRE (*AutoImmune REgulator*)**, molte proteine che originariamente erano ritenute tessuto-specifiche. Le mutazioni del gene *AIRE* sono la causa di una malattia autoimmune che colpisce diversi organi, detta *sindrome poliendocrina autoimmune* di tipo 1 **(*Autoimmune Polyendocrine Syndrome type* 1, APS1).** Questo gruppo di malattie è caratterizzato da lesioni causate da anticorpi e linfociti in molteplici organi endocrini, fra cui paratiroidi, ghiandole surrenali e isole pancreatiche. Un modello murino di APS1 è stato sviluppato attraverso il knockout del gene *AIRE* e ricapitola molte caratteristiche della malattia che colpisce l'uomo. Studi condotti nel modello murino hanno dimostrato che diverse proteine espresse negli organi periferici (come l'insulina nel pancreas) sono anche espresse, a bassi livelli, nelle cellule epiteliali timiche della midollare e i linfociti T immaturi che riconoscono questi antigeni vengono eliminati. In assenza della proteina AIRE funzionante (come nei pazienti con APS1 e nei topi knockout), questi antigeni non sono espressi nel timo e le relative cellule T specifiche, in assenza della selezione negativa, maturano e raggiungono i tessuti periferici dove sono in grado di attaccare i rispettivi tessuti che normalmente esprimono questi antigeni (Fig. 15-3). La proteina AIRE è un regolatore di trascrizione che promuove l'espressione di antigeni tessuto-specifici nel timo ed è un componente di un complesso multiproteico coinvolto nella trascrizione e nello srotolamento e rimodellamento della cromatina. AIRE contribuisce, inoltre, alla processazione del pre-mRNA e promuove l'accumulo dell'mRNA processato dei geni che codificano per gli antigeni di tessuti periferici. I meccanismi attraverso cui AIRE promuove l'espressione di una vasta gamma di antigeni tissutali in una popolazione cellulare del timo non sono ancora noti.

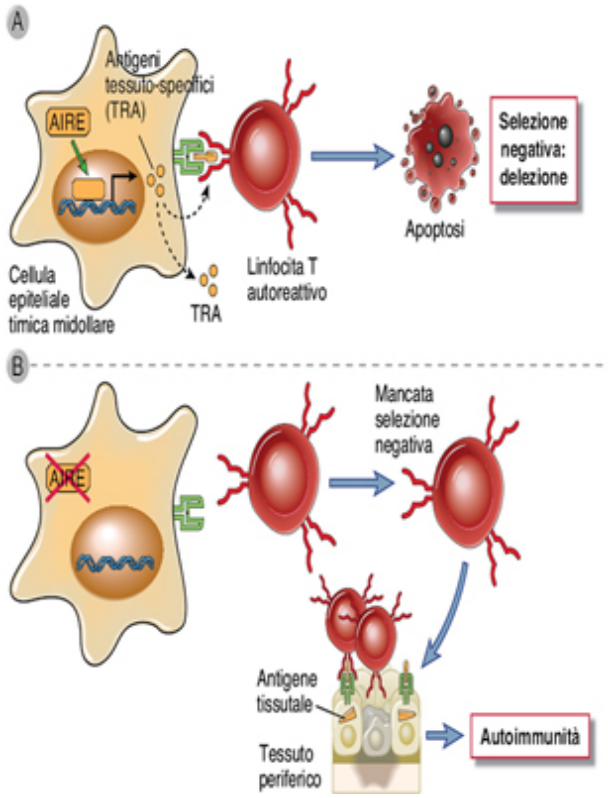


FIGURA 15-3 Ruolo di AIRE nell'eliminazione dei linfociti T nel timo. A. La proteina AIRE fa parte di un complesso che regola l'espressione di antigeni tessuto-specifici (TRA) nelle cellule epiteliali timiche midollari (MTEC). I peptidi derivati da questi antigeni sono presentati dalle MTEC e riconosciuti da linfociti T immaturi, causando in tal modo l'eliminazione di numerosi linfociti T autoreattivi. **B.** In assenza della proteina AIRE funzionale, questi T autoreattivi non vengono eliminati e possono raggiungere i tessuti in cui gli antigeni sono prodotti, causando danno tissutale.

Alcuni linfociti T CD4$^+$ autoreattivi che incontrano gli antigeni self nel timo non vengono eliminati ma si differenziano invece in linfociti T regolatori specifici per questi antigeni (vedi Fig. 15-2). I linfociti T regolatori lasciano il timo e inibiscono le risposte contro gli antigeni self nei tessuti periferici. Ciò che determina la scelta fra delezione e sviluppo di linfociti T regolatori non è noto. Possibili fattori sono l'affinità con cui viene riconosciuto l'antigene, il tipo di cellula che presenta l'antigene (APC) e la presenza nel timo di particolari citochine prodotte localmente. Le caratteristiche e le funzioni dei linfociti T regolatori saranno descritte più avanti nel contesto della tolleranza periferica, perché queste cellule hanno il compito di inibire le risposte nei tessuti periferici.

Tolleranza periferica dei linfociti T

I meccanismi di tolleranza periferica sono l'anergia (mancata responsività funzionale), l'inibizione da parte dei linfociti T regolatori e delezione (morte cellulare) (Fig. 15-4). Tali meccanismi sono responsabili del mantenimento della tolleranza dei linfociti T verso gli antigeni autologhi tessuto-specifici, specialmente verso quelli scarsamente rappresentati a livello timico. Non è attualmente noto quale dei diversi meccanismi sia maggiormente responsabile del mantenimento della tolleranza agli antigeni self o se tutti i diversi meccanismi concorrano contemporaneamente a prevenire manifestazioni autoimmuni. Gli stessi meccanismi possono anche essere responsabili della mancata responsività a forme tollerogeniche di antigeni non self.

Anergia (mancata responsività)

L'esposizione dei linfociti T CD4$^+$ maturi a un antigene in assenza di segnali costimolatori o la mancanza di attivazione dell'immunità innata possono rendere i linfociti incapaci di rispondere a un determinato antigene. In questo processo, definito anergia, le cellule autoreattive non muoiono ma diventano non responsive verso quell'antigene. Abbiamo precedentemente introdotto il concetto che la piena attivazione dei linfociti T richiede sia il riconoscimento dell'antigene da parte del TCR (che fornisce il segnale 1) sia il riconoscimento di molecole costimolatorie, principalmente B7-1 e B7-2 (segnale 2) (vedi Cap. 9). La prolungata disponibilità di segnale 1 (cioè il riconoscimento dell'antigene) in assenza del segnale 2 porta ad anergia. È verosimile che gli antigeni self vengano continuamente presentati ai linfociti T specifici in assenza di un'attivazione dell'immunità innata e quindi in assenza di una forte costimolazione. Lo stato di anergia causato dal solo riconoscimento dell'antigene è stato dimostrato in molteplici modelli sperimentali, come lo studio *in vitro* di cloni di linfociti T stimolati con l'antigene (questi studi hanno originariamente permesso di definire il concetto di anergia) e in studi *in vivo* in cui gli antigeni sono stati somministrati in assenza di adiuvanti o in studi effettuati con topi transgenici, basati sull'espressione congenita di antigeni proteici e sul loro riconoscimento da parte dei linfociti T in assenza di infiammazione e di attivazione dell'immunità innata. Una condizione anomala, in quanto il riconoscimento degli antigeni di origine microbica è normalmente associato

all’attivazione della risposta infiammatoria. In molte di queste situazioni, i linfociti T che riconoscono gli antigeni diventano funzionalmente non responsivi e sopravvivono per giorni o settimane in uno stato quiescente.

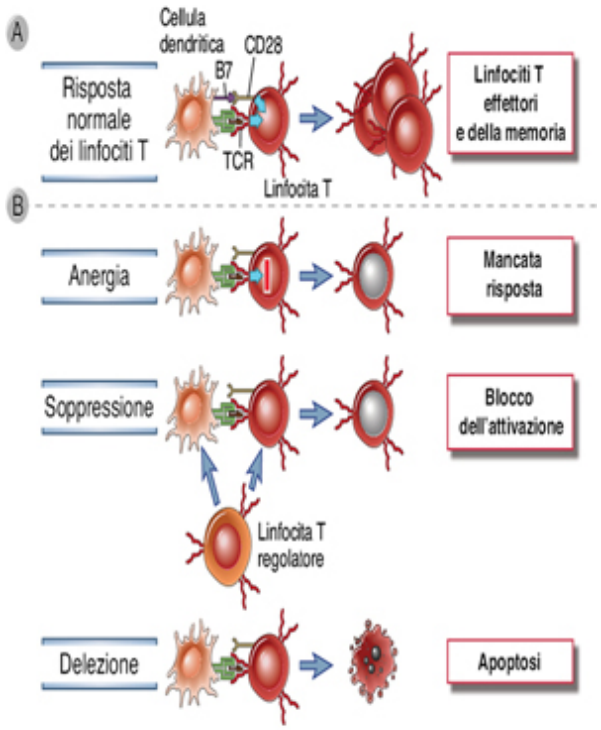


FIGURA 15-4 Meccanismi di tolleranza periferica dei linfociti T. Sono qui mostrati i segnali coinvolti in una normale risposta immunitaria (**A**) e i tre principali meccanismi di tolleranza periferica dei linfociti T (**B**).

L’anergia deriva da alterazioni biochimiche che riducono la capacità dei linfociti di rispondere a segnali che provengono dal recettore per l’antigene (Fig. 15-5). Si ritiene che numerose vie di trasduzione cooperino per mantenere questo stato di non responsività.

- ***La trasduzione del segnale da parte del TCR è bloccata nelle cellule anergiche.*** A seconda del modello sperimentale utilizzato questo può essere associato alla minore espressione del TCR (forse a causa di una sua aumentata degradazione; vedi più avanti) o al reclutamento nel complesso del TCR di molecole inibitorie, come le tirosine fosfatasi.
- ***Il riconoscimento di antigeni self può attivare le ligasi in grado di ubiquitinare le proteine associate al TCR e indirizzarle alla***

degradazione nel proteasoma o nei lisosomi. Ne deriva la riduzione del numero di molecole coinvolte nella trasduzione del segnale, con la conseguente riduzione dell'attivazione cellulare (vedi Cap. 7, Fig. 7-22). Una delle ubiquitine ligasi importanti nei linfociti T è Cbl-b. Topi knockout per questa ligasi presentano una proliferazione spontanea dei linfociti T e manifestazioni autoimmuni che suggeriscono il coinvolgimento di questo enzima nel mantenimento della tolleranza agli antigeni self. Al momento non è chiaro perché la mancanza di costimolazione, che in genere accompagna il riconoscimento degli antigeni self, sia in grado di attivare queste ubiquitine ligasi, mentre i segnali di costimolazione associati al riconoscimento degli antigeni non self siano inattivi o scarsamente efficaci.

- ***I linfociti T che riconoscono gli antigeni self possono reclutare i recettori inibitori della famiglia di CD28 in grado di bloccare la loro attivazione***. Le funzioni dei principali recettori inibitori dei linfociti T sono descritte nel paragrafo seguente.

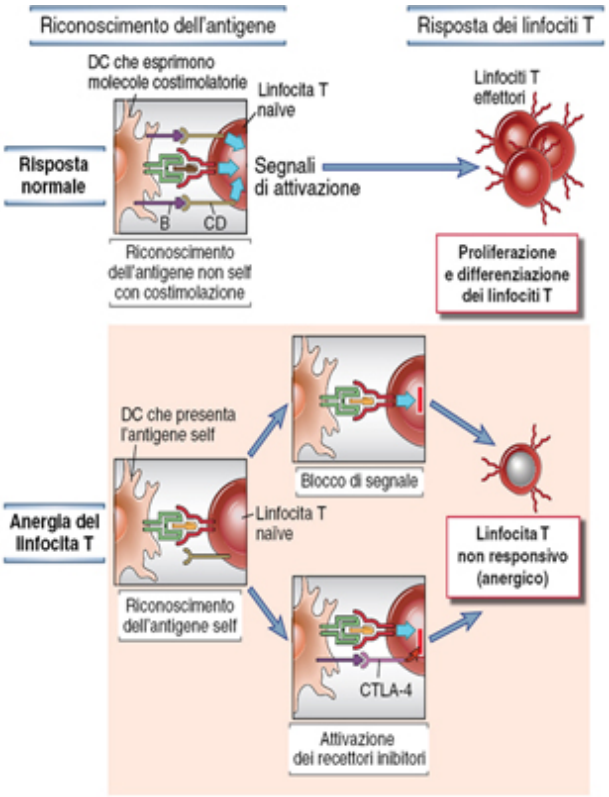


FIGURA 15-5 Meccanismi di anergia dei linfociti T. La risposta dei linfociti T viene attivata quando le cellule riconoscono un antigene presentato da cellule accessorie (APC) e i recettori dei linfociti T (per esempio CD28) riconoscono le molecole costimolatorie espresse dalle APC (per esempio B7). Se il linfocita T riconosce un antigene self in assenza di costimolazione, diventa non responsivo all'antigene a causa di un blocco nei segnali generati dal complesso del TCR o per l'ingaggio di recettori inibitori (come CTLA-4 e PD-1). Il blocco della trasduzione del segnale può derivare dal reclutamento di una fosfatasi al complesso TCR o dall'attivazione di ubiquitine ligasi che portano alla degradazione delle molecole deputate alla trasduzione. Indipendentemente dal meccanismo, le cellule rimangono vitali ma incapaci di rispondere all'antigene self. DC (*Dendritic Cell*), cellula dendritica.

Regolazione delle risposte dei linfociti T per azione dei recettori inibitori

Nel Capitolo 9 abbiamo introdotto il concetto che l'esito finale del riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti T, e principalmente dei $CD4^+$, è determinato dall'interazione dei segnali provenienti dai recettori attivatori e inibitori. Nonostante oggi si conoscano molti recettori inibitori, quelli maggiormente implicati nel processo di tolleranza al self sono CTLA-4 e PD-1 (*Programmed cell Death 1*, così chiamato perché in origine si riteneva erroneamente che fosse implicato nella morte cellulare programmata dei linfociti T). Studi condotti su questi recettori hanno permesso di approfondire la nostra conoscenza dei meccanismi di tolleranza e portato allo sviluppo di nuovi approcci terapeutici per regolare le risposte immunitarie. Le funzioni e i meccanismi d'azione di questi recettori sono trattati di seguito.

CTLA-4. CTLA-4 è un membro della famiglia di CD28 (vedi Fig. 9-5) e, come il recettore di attivazione CD28, si lega alle molecole B7. L'importanza di CTLA-4 nell'induzione della tolleranza è dimostrata dalla scoperta che i topi knockout per questa proteina sono caratterizzati da eccessiva attivazione linfocitaria, linfadenopatia, splenomegalia e da un infiltrato linfocitario che ricorda quello delle malattie autoimmuni. In altre parole, l'assenza del controllo negativo svolto da CTLA-4 determina la mancanza della tolleranza periferica e una grave patologia ad opera dei linfociti T. Nei modelli sperimentali, il blocco di CTLA-4 mediante l'utilizzo di anticorpi specifici porta all'aumento di patologie autoimmuni, come l'encefalomielite che si genera in seguito all'immunizzazione con antigeni della mielina e il diabete causato dall'inoculo di linfociti T specifici per antigeni delle cellule β delle isole pancreatiche. Inoltre, nell'uomo, i polimorfismi del gene *CTLA-4* sono associati a gravi malattie autoimmuni,

come il diabete di tipo 1 e il morbo di Graves. Tutte queste osservazioni, nonché i risultati emersi nell'ambito degli studi clinici discussi di seguito, indicano che CTLA-4 svolge un ruolo omeostatico di controllo sulla funzione T.

CTLA-4 svolge due importanti azioni:

- L'espressione di CTLA-4 si mantiene su bassi livelli nella maggioranza dei linfociti T fino all'attivazione delle cellule da parte dell'antigene, e, una volta espresso, il CTLA-4 pone fine all'attivazione continua dei linfociti T che rispondono all'antigene.
- Il CTLA-4 è espresso dai linfociti T regolatori, descritti di seguito, ed è responsabile delle funzioni inibitorie attraverso il blocco dell'attivazione dei linfociti T naïve.

Si ritiene che CTLA-4 eserciti il proprio ruolo inibitorio attraverso due meccanismi principali (Fig. 15-6):

- ***Blocco della trasduzione del segnale.*** L'ingaggio di CTLA-4 da parte di B7 attiva una fosfatasi, che rimuove i gruppi fosfato dalle molecole coinvolte nella trasduzione del segnale del TCR e CD28, interrompendo in tal modo le risposte.
- ***Riduzione della disponibilità di B7.*** CTLA-4, specialmente nei linfociti T regolatori, si lega alle molecole B7 espresse dalle APC e ne previene il legame con CD28. Inoltre, legandosi alle molecole B7 ne provoca l'endocitosi, riducendone l'espressione sulle APC. Il risultato è che i livelli di B7 disponibili a legarsi a CD28 sono ridotti e la carenza di costimolazione determina una riduzione della risposta dei linfociti T.

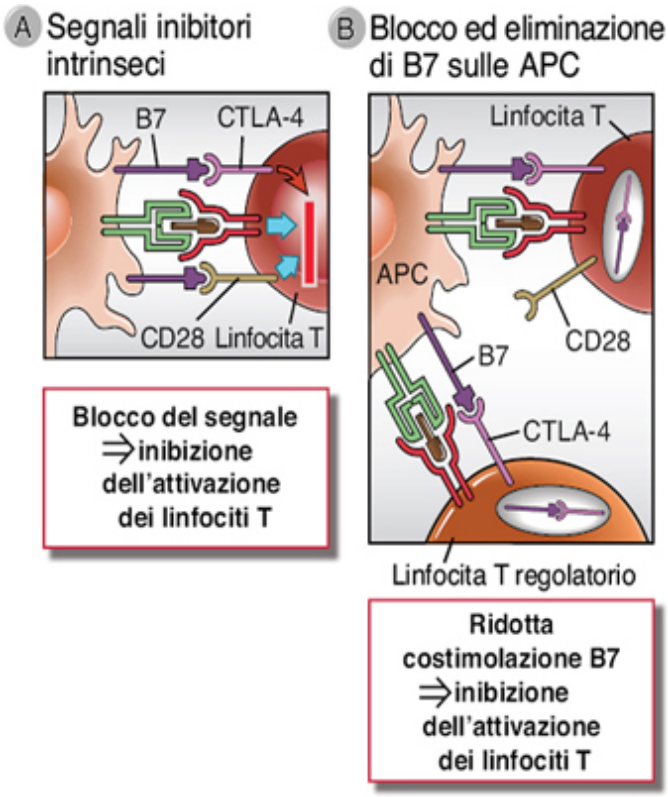


FIGURA 15-6 Meccanismo d'azione di CTLA-4. A. Il legame di CTLA-4 su un linfocita T può inviare segnali inibitori che interrompono un'ulteriore attivazione di questa cellula (funzione cellulare intrinseca di CTLA-4). **B.** Nei linfociti T regolatori o effettori CTLA-4 si lega alle molecole B7 espresse dalle APC oppure elimina le molecole B7 dalla superficie delle APC, sottraendole alla possibilità di legame a CD28 e bloccando l'attivazione dei linfociti T. L'inibizione da parte di CTLA-4 a opera dei linfociti T regolatori è un'azione cellulare estrinseca di questo recettore inibitorio (poiché i linfociti T effettori sono soppressi da un'altra cellula).

Non è ancora chiaro che cosa definisce se le molecole B7 debbano legarsi a CD28, per l'attivazione dei linfociti T (come nell'ambito dei processi infettivi o immunizzazione con adiuvanti), o a CTLA-4, per bloccare le risposte dei linfociti T (per esempio durante la presentazione degli antigeni self). Nel Capitolo 9, abbiamo illustrato l'ipotesi secondo cui CTLA-4, considerata la sua maggiore affinità per B7, venga ingaggiato preferenzialmente quando le APC presentano antigeni self e mostrano una scarsa espressione di B7. Al contrario, i microbi, aumentando l'espressione di B7, spostano l'equilibrio verso il legame di CD28 e l'attivazione dei linfociti T. Altre tesi sostengono che CD28, espresso dai linfociti naïve, si leghi a B7 all'inizio della una risposta dei linfociti T, mentre CTLA-4, che è espresso dopo l'attivazione dei linfociti T, agisca per interrompere le risposte che sono già avviate.

La scoperta che CTLA-4 rappresenta un punto di controllo nell'ambito delle risposte immunitarie ha portato all'idea che l'attivazione linfocitaria possa essere promossa attraverso la riduzione dell'inibizione, un processo noto come blocco dei punti di controllo. Il blocco di CTLA-4 con anticorpi determina un aumento delle risposte immunitarie ai tumori (vedi Cap. 18). L'anticorpo anti-CTLA-4 è oggi autorizzato per il trattamento di melanomi in stadio avanzato, ed è efficace anche in altri tipi di cancro. Come prevedibile, alcuni dei pazienti trattati sviluppano manifestazioni di autoimmunità con infiammazione in diversi organi.

PD-1 è un secondo recettore inibitorio della famiglia di CD28. PD-1 riconosce due ligandi, chiamati PD-L1 e PD-L2; PD-L1 è espresso dalle APC e da molte altre cellule tissutali, mentre PD-L2 è espresso principalmente dalle APC. L'ingaggio di PD-1 da parte di uno dei due ligandi porta all'inattivazione dei linfociti T. I topi knockout per PD-1 sviluppano malattie autoimmuni, come la nefrite lupica e l'artrite. In generale, le malattie autoimmuni nei topi knockout per PD-1 sono meno severe rispetto a quelle osservate negli animali knockout per CTLA-4. PD-1 inibisce le risposte dei linfociti T alla stimolazione con l'antigene, presumibilmente attraverso l'attivazione di segnali inibitori. L'utilizzo di anticorpi anti-PD-1 e anti-PD-L1 in diversi tipi di neoplasie maligne sta mostrando un'efficacia ancora maggiore, con una minore tossicità, rispetto agli anticorpi anti-CTLA-4 (vedi Cap. 18).

Anche se CTLA-4 e PD-1 sono recettori inibitori appartenenti alla stessa famiglia, le loro funzioni non sono del tutto sovrapposte. CTLA-4 sembra essere più importante ai fini del controllo delle fasi iniziali di attivazione dei linfociti T $CD4^+$ T negli organi linfoidi ed è coinvolto nella funzione inibitoria dei linfociti T regolatori. PD-1 è invece importante nel porre fine alle risposte dei linfociti T effettori, specialmente linfociti $CD8^+$ nei tessuti periferici e non sembra importante per le funzioni dei linfociti T regolatori. Inoltre, sono stati identificati altri recettori inibitori, fra cui alcuni appartenenti alla famiglia del recettore del TNF e altri alla famiglia del TIM. Vi è attualmente un grande interesse nella definizione del ruolo di questi recettori nella tolleranza al self e nella regolazione delle risposte immunitarie con lo scopo di conoscere il potenziale terapeutico di queste molecole.

Inibizione da parte dei linfociti T regolatori

L'idea che alcuni linfociti possano controllare le risposte di altri linfociti è stata proposta molti anni fa. Successivamente, questa ipotesi è stata avvalorata da osservazioni sperimentali che hanno effettivamente identificato l'esistenza di tali popolazioni inibitorie. L'esistenza dei linfociti T soppressori ha caratterizzato l'immunologia degli anni Settanta, tuttavia, per molti anni i tentativi di identificare questa popolazione cellulare e di definirne meglio il meccanismo d'azione sono stati privi di successo. Solo recentemente questo settore di ricerca ha avuto un nuovo impulso grazie alla possibilità di utilizzare nuovi approcci per identificare, purificare e analizzare le popolazioni di linfociti T dotate di azione inibitoria. Queste cellule sono oggi chiamate linfociti T regolatori e le loro funzioni verrano descritte di seguito.

I linfociti T regolatori sono una sottopopolazione dei linfociti T CD4$^+$ e hanno la funzione di inibire le risposte immunitarie e mantenere la tolleranza al self (Fig. 15-7). La maggioranza di queste cellule esprime elevati livelli della catena α (CD25) del recettore dell'interleuchina 2 (IL-2) in assenza di altri marcatori di attivazione linfocitaria. Un fattore trascrizionale chiamato FoxP3, membro della famiglia di fattori trascrizionali *forkhead*, svolge un ruolo cruciale nello sviluppo e nella funzione della maggior parte dei linfociti T regolatori. Topi con mutazioni del gene *foxp3*, spontanee o indotte sperimentalmente, sviluppano una sindrome autoimmune multisistemica caratterizzata dall'assenza dei linfociti T regolatori CD25$^+$. Una rara malattia autoimmune nell'uomo detta sindrome **IPEX** (*Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked*; disregolazione del sistema immunitario, poliendocrinopatia, enteropatia, legata al cromosoma X) è causata da mutazioni nel gene *FOXP3* ed è associata a una carenza di linfociti T regolatori. Queste osservazioni hanno definito l'importanza dei linfociti T regolatori nel mantenimento della tolleranza al self. La migliore comprensione del ruolo fisiologico di questi linfociti ha rinvigorito l'interesse nei loro confronti, anche in considerazione del loro possibile ruolo nell'insorgenza di malattie autoimmuni e come potenziale strumento terapeutico per il trattamento di malattie infiammatorie.

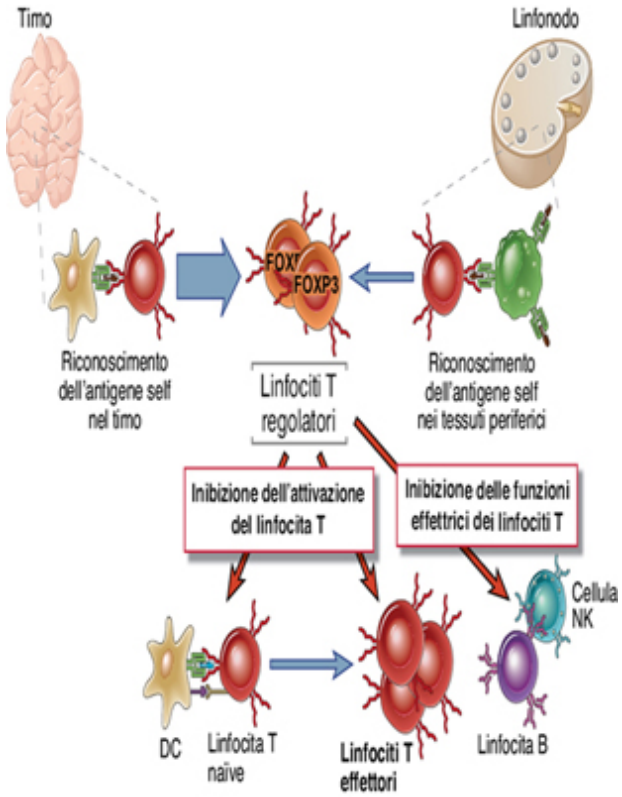


FIGURA 15-7 Linfociti T regolatori. Questi linfociti vengono generati dal riconoscimento degli antigeni self nel timo (in questo caso vengono anche chiamati linfociti regolatori naturali) o (anche se probabilmente in minore misura) dal riconoscimento dell'antigene negli organi linfoidi periferici (in questo caso vengono chiamati linfociti regolatori inducibili o adattativi). Lo sviluppo e la sopravvivenza dei linfociti T regolatori necessita dell'IL-2 e del fattore di trascrizione FoxP3. Nei tessuti periferici i linfociti T regolatori sopprimono l'attivazione e la funzione effettrice dei linfociti autoreattivi.

Marcatori fenotipici ed eterogeneità dei linfociti T regolatori

Le cellule con capacità inibitorie meglio definite sono i linfociti T $CD4^+$ $FoxP3^+$ $CD25^{high}$, sebbene molte popolazioni T siano in grado di sopprimere la risposta immunitaria. Sia FoxP3 sia CD25 sono essenziali per la generazione, il mantenimento e la funzione di queste cellule. I linfociti T regolatori esprimono generalmente bassi livelli del recettore dell'IL-7 (CD127) e quindi utilizzano l'IL-2, ma non l'IL-7, come fattore di crescita e di sopravvivenza. Inoltre, i linfociti T regolatori $FoxP3^+$ generalmente esprimono elevati livelli di CTLA-4, molecola coinvolta nella loro funzione biologica (già trattata in precedenza). La demetilazione del locus genico FOXP3 e di altri loci contenenti geni espressi in queste cellule serve a

mantenere stabile il fenotipo dei linfociti T regolatori, e il riscontro di queste variazioni epigenetiche trova oggi impiego per identificare la presenza di linfociti T regolatori nell'ambito di studi sperimentali e clinici.

Origine e differenziazione dei linfociti T regolatori

I linfociti T regolatori hanno origine nel timo o negli organi linfoidi secondari in seguito al riconoscimento degli antigeni self o non self (linfonodi). Nel timo lo sviluppo dei linfociti T regolatori è uno dei possibili sviluppi per i linfociti T $CD4^+$ che riconoscono antigeni self; queste cellule vengono anche chiamate linfociti T regolatori timici (tTreg) o naturali. Negli organi linfoidi periferici il riconoscimento dell'antigene in assenza di una forte attivazione dell'immunità innata favorisce la generazione di cellule regolatorie a partire dai linfociti T $CD4^+$ naïve; in alcuni casi i linfociti T regolatori possono originare in condizioni infiammatorie. Questi linfociti T regolatori periferici (pTreg) sono definiti adattativi o inducibili, poiché vengono indotti a partire da linfociti T $CD4^+$ naïve nei tessuti linfoidi secondari come adattamento del sistema immunitario a particolari condizioni di risposta all'antigene. Come è logico attendersi, i linfociti T regolatori timici sono specifici per gli antigeni self, poiché questi sono gli antigeni con cui vengono in contatto nel timo. I linfociti regolatori periferici possono essere invece specifici per antigeni self o non self.

La generazione di alcuni linfociti T regolatori richiede la citochina TGF-β. La coltura di linfociti T naïve con anticorpi che attivano il TCR e TGF-β (e IL-2, trattato di seguito) può portare allo sviluppo *in vitro* di linfociti regolatori. Nei modelli murini, l'eliminazione di TGF-β o il blocco dei segnali di attivazione di TGF-β nei linfociti T determina lo sviluppo di una malattia infiammatoria sistemica causata dall'attivazione leucocitaria incontrollata e dalla carenza di linfociti T regolatori funzionali. TGF-β stimola l'espressione di FoxP3, il fattore trascrizionale necessario per lo sviluppo e il funzionamento dei linfociti T regolatori.

La sopravvivenza e le funzioni dei linfociti T regolatori dipendono dalla citochina IL-2. I topi knockout per il gene dell'IL-2 o per le catene α o β del suo recettore sviluppano una sindrome autoimmune che si manifesta con malattia infiammatoria intestinale, anemia emolitica autoimmune e produzione di autoanticorpi (inclusi anticorpi antieritrociti e anti-DNA).

Questi topi sono privi di linfociti T regolatori $CD25^+$ $FoxP3^+$ e la malattia viene curata con il ripristino di queste cellule. L'IL-2 promuove la differenziazione dei linfociti T regolatori ed è essenziale per la loro sopravvivenza. Inoltre, IL-2 attiva il fattore trascrizionale STAT5 che stimola l'espressione del gene *FoxP3* e di altri geni coinvolti nelle funzioni dei linfociti T regolatori. Questi risultati rappresentano il razionale scientifico per alcuni studi clinici volti a esplorare la possibilità di utilizzare IL-2 per promuovere lo sviluppo di linfociti T regolatori per il controllo della reazione del trapianto verso l'ospite, di infiammazioni autoimmuni e del rigetto in soggetti sottoposti a trapianto di organo.

Alcune sottopopolazioni di DC svolgono un ruolo importante nello sviluppo dei linfociti T regolatori a livello dei tessuti periferici e le DC stimolate con acido retinoico, un analogo della vitamina A, sono in grado di promuovere lo sviluppo di linfociti T regolatori, specialmente nei tessuti linfoidi associati alle mucose (vedi Cap. 14).

Meccanismi d'azione dei linfociti T regolatori

I linfociti T regolatori sono in grado di inibire le risposte immunitarie a diversi livelli: durante l'attivazione dei linfociti T negli organi linfoidi, ma anche durante la loro fase effettrice nei tessuti. Possono, inoltre, sopprimere direttamente l'attivazione dei linfociti B e inibire la proliferazione e la differenziazione delle cellule killer naturali (NK). Anche se sono state avanzate svariate ipotesi sui meccanismi di soppressione, di seguito si riportano quelli meglio congruenti con i dati disponibili.

- ***Produzione delle citochine immunosuppressive IL-10 e TGF-β***. La biologia di queste citochine verrà dettagliatamente descritta più avanti.
- ***Ridotta capacità delle APC di stimolare i linfociti T.*** Uno dei meccanismi proposti sottostante questa azione dipende dal legame di CTLA-4, espresso dai linfociti regolatori, alle molecole B7 espresse dalle APC, descritto in precedenza (vedi Fig. 15-6).
- ***Consumo di IL-2.*** Per effetto dell'elevato livello di espressione del recettore IL-2, queste cellule possono assorbire IL-2 e deprivare altre popolazioni cellulari di questo fattore di crescita, determinando una

ridotta proliferazione e differenziazione di altre cellule anch’esse dipendenti da IL-2.

Non è ancora chiaro se le diverse cellule dotate di attività inibitoria utilizzino tutti questi meccanismi o se ci siano popolazioni che prediligono specifici meccanismi per controllare le risposte immunitarie. Infatti, nell’uomo sono state descritte due popolazioni di linfociti T regolatori che possono essere distinte in base all’espressione del fattore FoxP3 e alla produzione dell’IL-10.

I linfociti T regolatori producono citochine con azione inibitoria

Il TGF-β e l’IL-10 sono due citochine coinvolte nello sviluppo e nella funzione dei linfociti T regolatori. Queste citochine sono prodotte da molte popolazioni cellulari, oltre che dai linfociti T regolatori, e agiscono su molti tipi di cellule; di seguito ne descriviamo le proprietà.

TGF-β (Fattore-β di crescita trasformante). Il TGF-β fu originariamente identificato come una proteina secreta dai tumori in grado di favorire la sopravvivenza delle cellule tumorali *in vitro*. I TGF-β sono in realtà una famiglia di citochine strettamente correlate tra loro ma codificate da geni distinti, comunemente denominati TGF-β1, TGF-β2 e TGF-β3. Le cellule del sistema immunitario sintetizzano principalmente il TGF-β1, prodotto dai linfociti T regolatori $CD4^+$, dai fagociti mononucleati attivati e da altri tipi cellulari. Il TGF-β1 viene sintetizzato come precursore inattivo che deve essere scisso proteoliticamente a livello dell’apparato di Golgi per formare un omodimero. Il TGF-β1 maturo viene secreto in forma inattiva, in associazione ad altri polipeptidi che devono essere rimossi attraverso la digestione enzimatica per permettere alla citochina di legare il suo recettore ed esercitare l’attività biologica. Il recettore per il TGF-β1 è costituito da due catene, TGF-βRI e TGF-βRII, entrambe coinvolte nella fosforilazione dei fattori trascrizionali della famiglia SMAD. In seguito al legame della citochina, un dominio dotato di attività proteinchinasica (serina/treonina) del TGF-βRI fosforila i fattori SMAD2 e SMAD3 che si associano a SMAD4 e traslocano al nucleo per legare le regioni promotrici presenti sui geni bersaglio e regolarne la trascrizione.

Il TGF-β svolge funzioni importanti e diversificate nel sistema immunitario.

- ***Inibisce la proliferazione e le funzioni effettrici dei linfociti T e l'attivazione dei macrofagi.*** Il TGF-β inibisce l'attivazione in senso "classico" dei macrofagi, ma è anche una delle citochine secrete dai macrofagi attivati in modo "alternativo" (vedi Cap. 10). Inibisce l'attivazione di altre cellule, come i neutrofili e le cellule endoteliali, svolgendo un ruolo importante nell'attenuare e terminare le risposte immunitarie e infiammatorie.
- ***Regola la differenziazione di sottopopolazioni di linfociti T.*** Come descritto precedentemente, TGF-β stimola lo sviluppo dei linfociti T regolatori periferici FoxP3$^+$. In combinazione con altre citochine prodotte durante le risposte immunitarie innate (per esempio IL-1 e IL-6), in virtù della sua capacità di attivare il fattore trascrizionale RORgt, promuove lo sviluppo della sottopopolazione T_H17 dei linfociti T CD4$^+$ (vedi Cap. 10). La capacità del TGF-β di inibire le risposte immunitarie e infiammatorie, in parte attraverso i linfociti T regolatori, e di promuovere lo sviluppo di cellule pro infiammatorie, i linfociti T_H17, in presenza di altre citochine, è un esempio interessante di come una singola citochina possa svolgere azioni diverse, a volte opposte, a seconda del contesto in cui viene prodotta. Il TGF-β inoltre inibisce lo sviluppo dei linfociti T_H1 e T_H2.
- ***Agendo sui linfociti B, il TGF-β promuove lo scambio isotipico verso le IgA***, che sono la principale classe di anticorpi principalmente coinvolta nella risposta immunitaria a livello delle mucose (vedi Cap. 14).
- ***Promuove la riparazione dei tessuti al termine dei processi reattivi locali.*** Questa funzione dipende principalmente dalla capacità di stimolare nei macrofagi e nei fibroblasti la sintesi di collageno e di enzimi preposti al rimodellamento della matrice extracellulare e di promuovere il processo angiogenetico. Questa citochina può anche avere un ruolo patogenetico in malattie caratterizzate dal processo fibrotico, come la fibrosi polmonare e la sclerosi sistemica.

Interleuchina-10. L'IL-10 è una citochina che, inibendo i macrofagi attivati e le DC, è coinvolta nel controllo delle risposte innate e dell'immunità cellulo-mediata. È un membro della famiglia delle citochine eterodimeriche che comprende IL-22, IL-27 e altre. Il recettore per l'IL-10 appartiene alla famiglia dei recettori per le citochine di tipo II (analoghi ai recettori per gli interferoni) ed è costituito da due catene che si associano a Jak1 e Tyk2 e che attivano il fattore di trascrizione STAT3. L'IL-10 è prodotta da molte popolazioni cellulari, tra cui macrofagi attivati, DC, linfociti T regolatori, T_H1 e T_H2. L'IL-10 funge da regolatore a feedback negativo poiché è prodotta dai macrofagi e dalle DC ma al contempo ne inibisce l'attività. IL-10 è inoltre prodotta da alcuni linfociti B, che hanno dimostrato di svolgere funzioni immunosoppressive e sono stati definiti **linfociti B regolatori**.

Gli effetti biologici dell'IL-10 dipendono dalla sua capacità di inibire molte delle funzioni dei macrofagi attivati e delle DC.

- ***L'IL-10 inibisce la produzione di IL-12 da parte dei macrofagi attivati e delle DC***. L'IL-12 è un segnale cruciale per la produzione di interferone γ (IFN-γ). Dato che l'IFN-γ svolge un ruolo importante nelle risposte innate e cellulo-mediate dirette verso i microrganismi intracellulari, bloccando la produzione di IL-12, l'IL-10 regola negativamente queste risposte. Originariamente, l'IL-10 fu descritta proprio come segnale inibitore della produzione di IFN-γ.
- ***L'IL-10 inibisce l'espressione di molecole costimolatorie e di molecole MHC di classe II da parte dei macrofagi e delle DC***. In questo modo l'IL-10 inibisce l'attivazione dei linfociti T e pone fine alle risposte cellulo-mediate.

È stata descritta una rara malattia autoimmune in cui le mutazioni del recettore per l'IL-10 causano una severa colite che si sviluppa nel corso del primo anno di vita. Anche topi knockout per l'IL-10, in tutte le cellule o esclusivamente nei linfociti T regolatori, sviluppano colite, probabilmente a causa della mancata regolazione delle risposte dei macrofagi nei confronti dei microrganismi enterici. Alla luce di questi dati, si ritiene quindi che questa citochina svolga un importante ruolo nel controllo delle reazioni infiammatorie a livello delle mucose, in modo particolare nel tratto gastrointestinale (vedi Cap. 14).

Il genoma del virus di Epstein-Barr contiene una sequenza omologa a quella del gene per l'IL-10 che codifica per una proteina con attività biologiche simili alla citochina umana. L'acquisizione di questo pseudogene ha verosimilmente conferito al virus un vantaggio evolutivo, associato alla capacità di bloccare la risposta immunitaria e, di fatto, prolungare la sua sopravvivenza nelle cellule dell'ospite.

Ruolo dei linfociti T regolatori nella tolleranza al self e nell'autoimmunità

La comprensione delle basi genetiche della sindrome IPEX e di patologie simili causate nel topo da mutazioni nel gene Foxp3 costituiscono un'attestazione dell'importanza dei linfociti T regolatori nel mantenimento della tolleranza al self e dell'omeostasi nel sistema immunitario. Numerosi sforzi, raramente coronati da successo, sono stati indirizzati alla comprensione del ruolo dei linfociti T regolatori in molte delle comuni patologie autoimmuni in soggetti umani, come le malattie infiammatorie croniche dell'intestino, il diabete di tipo I e la sclerosi multipla e malattie allergiche. Sembra probabile che una carenza nei linfociti T regolatori o la resistenza dei linfociti effettori alla loro azione inibitoria contribuisca alla patogenesi di malattie autoimmuni e allergiche. Esiste, altresì, la possibilità di espandere linfociti regolatori in coltura e inocularli successivamente nel paziente al fine di controllarne le risposte immunitarie patologiche. Sono in corso studi clinici basati sul trasferimento dei linfociti T regolatori con lo scopo di inibire il rigetto di trapianto, la reazione del trapianto verso l'ospite e le malattie autoimmuni, nonché altre malattie infiammatorie. Sono, inoltre, in corso tentativi di indurre direttamente lo sviluppo di queste cellule nei pazienti attraverso la somministrazione di peptidi self coinvolti nelle reazioni autoimmuni e basse dosi della citochina IL-2, separatamente o in terapia combinata.

Delezione dei linfociti T mediante apoptosi

I linfociti T che riconoscono gli antigeni self a elevata affinità o che sono ripetutamente stimolati da antigeni persistenti possono morire per apoptosi. Esistono due vie principali di apoptosi (Fig. 15-8) ed entrambe sono coinvolte nell'eliminazione dei linfociti T maturi nei tessuti periferici.

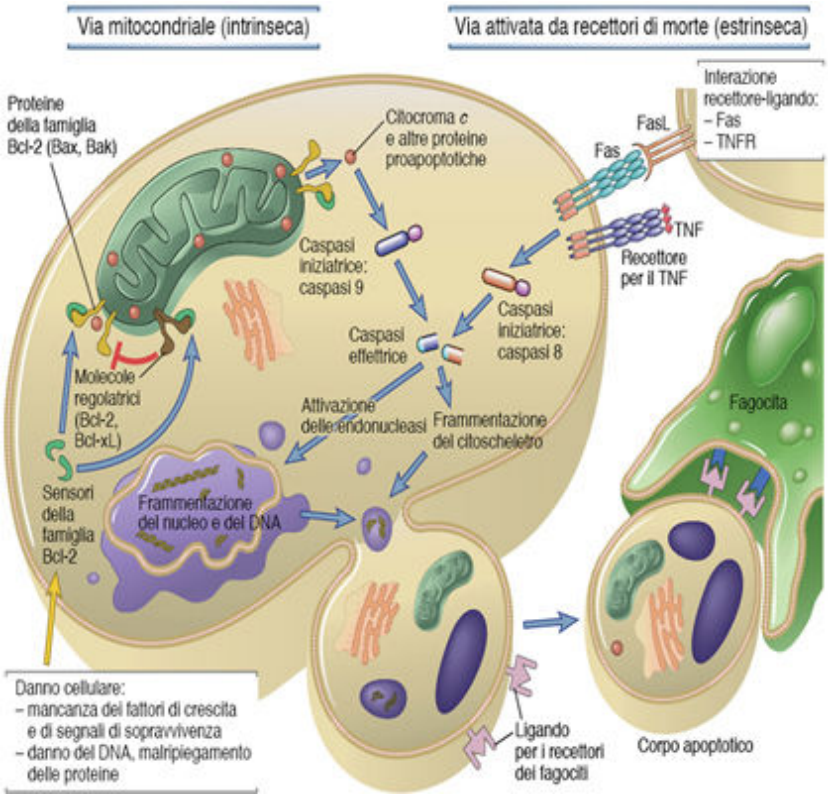


FIGURA 15-8 Vie di attivazione dell'apoptosi. L'apoptosi può essere attivata attraverso la via mitocondriale o quella recettoriale, che culminano nella frammentazione della cellula morta e nella fagocitosi dei corpi apoptotici (vedi testo).

- La **via mitocondriale** (o **intrinseca**) è regolata dalle proteine della famiglia Bcl-2, il cui capotistipite fu identificato come oncogene capace di inibire l'apoptosi in un linfoma di tipo B. Alcuni membri di questa famiglia sono proapoptotici, mentre altri sono antiapoptotici. Questa via ha inizio quando le proteine citoplasmatiche della famiglia Bcl-2, che appartengono alla sottofamiglia BH3-only (così chiamata perché le proteine contengono un solo dominio che è omologo al terzo dominio conservato dalle Bcl-2), vengono indotte o attivate durante la deprivazione dei fattori di crescita, in presenza di stimoli nocivi, danno al DNA o in seguito ad alcuni tipi di attivazione recettoriale (come forti segnali attivati dal riconoscimento di antigeni self nei linfociti immaturi). Le proteine BH3-only sono sensori di stress cellulare che possono legare e influenzare gli effettori e i regolatori di morte cellulare. Nei linfociti, il più importante di questi sensori è la proteina Bim. Nella sua forma attiva, Bim lega due proteine effettrici proapototiche della famiglia Bcl-2, chiamate Bax e Bak, che

oligomerizzano e si inseriscono nella membrana mitocondriale esterna, causando un aumento della permeabilità mitocondriale. I fattori di crescita e altri segnali di sopravvivenza causano l'espressione di membri antiapoptotici della famiglia Bcl-2, come Bcl-2 e Bcl-xL, che funzionano come inibitori dell'apoptosi bloccando le proteine Bax e Bak, mantenendo quindi intatti i mitocondri. Anche le proteine BH3 antagonizzano le proteine Bcl-2 e Bcl-xL. Quando le cellule vengono deprivate dei segnali di sopravvivenza, la membrana mitocondriale aumenta la sua permeabilità, a causa dell'azione dei sensori delle proteine BH3-only, delle proteine effettrici Bak e Bax e della relativa carenza di proteine anti-apoptotiche come Bcl-2 e Bcl-xL. Ne consegue che molte componenti mitocondriali, incluso il citocromo *c*, vengono rilasciate nel citosol. Queste proteine attivano enzimi citosolici detti **caspasi**. Inizialmente è attivata la caspasi-9, che a sua volta taglia e attiva le caspasi a valle che portano alla frammentazione del DNA nucleare e ad altri eventi che culminano nella morte per apoptosi.

- La **via estrinseca dell'apoptosi**, mediata da recettore, si attiva in seguito all'ingaggio dei recettori di membrana, omologhi ai recettori del fattore di necrosi tumorale (*Tumor Necrosis Factor*, TNF), da parte dei rispettivi ligandi, a loro volta omologhi del TNF. L'oligomerizzazione di questi recettori determina l'attivazione di proteine adattatrici citoplasmatiche che reclutano la procaspasi-8, la quale si auto-attiva mediante taglio proteolitico, generando la caspasi-8 attiva. La caspasi-8 attiva esercita un taglio proteolitico delle caspasi a valle che portano all'apoptosi. In molti tipi cellulari, la caspasi-8 porta all'attivazione della proteina BH3-only, definita Bid, che si lega a Bax e Bak e attiva l'apoptosi attraverso la via mitocondriale. La via mitocondriale può quindi svolgere anche un ruolo di amplificazione della via della trasduzione del segnale dei recettori apoptotici.

Le cellule che vanno incontro ad apoptosi sviluppano estroflessioni della membrana e rilasciano frammenti di nucleo e citoplasma, chiamati corpi apoptotici. Le cellule apoptotiche presentano inoltre alterazioni biochimiche della membrana plasmatica, quali l'esposizione di lipidi (per esempio la fosfatidilserina) che generalmente risiedono nel foglietto interno della membrana plasmatica. Queste alterazioni vengono riconosciute da parte dei

recettori espressi dalle cellule fagocitiche e determinano la rimozione dei corpi e di cellule apoptotici; tutto ciò avviene in assenza di risposta infiammatoria.

Nonostante queste due strategie di morte possano funzionare in modo diverso l'una dall'altra per mantenere la tolleranza al self, la loro importanza è sottolineata da esperimenti condotti *in vivo* in cui l'inattivazione genetica dell'una o dell'altra via proapoptotica porta all'insorgenza di patologie autoimmuni sistemiche.

- ***I linfociti T che riconoscono gli antigeni self in assenza di segnali costimolatori attivano la proteina proapoptotica Bim che innesca la via mitocondriale dell'apoptosi***. Nel corso della risposta immunitaria, i linfociti ricevono segnali dal TCR, dalle molecole costimolatorie e dai fattori di crescita. Questi segnali stimolano l'espressione di proteine anti-apoptotiche della famiglia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL), che prevengono l'apoptosi e promuovono la sopravvivenza cellulare, preludio necessario alla proliferazione. Quando le cellule T riconoscono gli antigeni self con elevata avidità, la proteina Bim viene attivata e fa scattare il meccanismo di morte attraverso la via mitocondriale. In assenza di stimoli costimolatori e di fattori di crescita, i membri antiapoptotici della famiglia Bcl-2, Bcl-2 e Bcl-xL non vengono attivati e l'azione delle proteine Bim, Bax e Bak non viene quindi contrastata.

  La via mitocondriale di morte apoptotica innescata da Bim è anche coinvolta nella selezione negativa timica (descritta precedentemente) e nella risoluzione della risposta immunitaria che segue all'eliminazine dell'antigene (vedi Cap. 9).
- ***La ripetuta stimolazione dei linfociti T porta alla contemporanea espressione dei recettori che trasducono i segnali di morte cellulare e dei loro rispettivi ligandi che ne determinano la morte per apoptosi***. Nei linfociti T $CD4^+$, il recettore di morte più importante è Fas (CD95), il cui ligando prende il nome di *ligando di Fas* (FasL). Sulla base dell'omologia di sequenza, Fas viene considerato un membro della famiglia dei recettori del TNF e, analogamente, FasL è un omologo del TNF. La ripetuta attivazione dei linfociti T induce l'espressione in membrana di FasL che, a questo punto, può legare il recettore Fas espresso dalla stessa cellula o da cellule T adiacenti. Tale interazione

attiva una cascata di caspasi, che portano alla morte della cellula per apoptosi. La stessa via di apoptosi può intervenire nell'eliminazione dei linfociti B autoreattivi anche in periferia (come si vedrà più avanti).

I topi portatori di una mutazione omozigote dei geni che codificano per Fas o FasL hanno fornito la prova che la mancanza della morte per apoptosi dei linfociti è causa di autoimmunità. Questi topi, infatti, sviluppano una malattia autoimmune sistemica con autoanticorpi multipli e nefrite che assomiglia al lupus eritematoso sistemico (LES) dell'uomo (vedi Cap. 18). Il ceppo murino denominato *lpr* (abbreviazione di *lymphoproliferation*) produce bassi livelli della proteina Fas, mentre il ceppo *gld* (abbreviazione di *generalized lymphoproliferative disease*) produce una molecola di FasL contenente una mutazione puntiforme che interferisce con le sue funzioni di trasduzione del segnale intracellulare. La risposta autoimmune è dovuta all'accumulo di linfociti B e T autoreattivi come conseguenza della mancata eliminazione per apoptosi nei tessuti periferici. Mutazioni nel gene che codifica per Fas o in altri geni coinvolti nella via di morte attivata da Fas sono state identificate in soggetti pediatrici come causa di una patologia autoimmune oggi identificata con il nome di **sindrome linfoproliferativa autoimmune** (*Autoimmune LymphoProliferative Syndrome*, ALPS).

Tolleranza periferica dei linfociti T CD8$^+$

La maggior parte delle nostre conoscenze sulla tolleranza periferica dei linfociti T è limitata alle cellule T CD4$^+$; meno si sa circa i meccanismi di tolleranza nei linfociti T CD8$^+$. È probabile che i linfociti T CD8$^+$ divengano anergici quando riconoscono peptidi presentati da molecole MHC di classe I in assenza di segnali di costimolazione o in assenza di cooperazione da parte dei linfociti T helper. In questa situazione, le cellule T CD8$^+$ incontrerebbero il segnale 1 (l'antigene) in assenza del secondo segnale e il meccanismo di induzione dell'anergia dovrebbe essere essenzialmente identico a quello dei linfociti T CD4$^+$. I recettori inibitori come PD-1 sopprimono l'attivazione dei linfociti T CD8$^+$ e possono essere coinvolti nell'interruzione delle risposte, nell'ambito di un fenomeno definito di esaurimento clonale (vedi Cap. 11). I linfociti T regolatori CD25$^+$ possono inibire direttamente

l'attivazione dei linfociti T $CD8^+$ o sopprimere i linfociti $CD4^+$ T helper necessari per la completa attivazione dei linfociti T $CD8^+$. Le cellule T $CD8^+$ che sono esposte ad alte concentrazioni di antigeni self possono anche andare incontro ad apoptosi.

Fattori che determinano la tolleranza degli antigeni self

Studi condotti con un'ampia varietà di modelli sperimentali hanno dimostrato che le caratteristiche degli antigeni proteici sono responsabili dell'attivazione dei linfociti o dell'instaurarsi di uno stato di tolleranza (Tab. 15-1). Infatti, gli antigeni self hanno particolari proprietà che li rendono tollerogenici. Questi antigeni sono espressi in organi linfoidi primari, dove sono riconosciuti da linfociti immaturi. Nei tessuti periferici, gli antigeni self legano il recettore dell'antigene dei linfociti per periodi prolungati in assenza di infiammazione o immunità innata.

TABELLA 15-1 Fattori che determinano l'immunogenicità e la tollerogenicità di una proteina

	Condizioni che favoriscono la stimolazione delle risposte immunitarie	Condizioni che favoriscono la tolleranza
Persistenza	Breve (eliminati dalla risposta immunitaria)	Prolungata
Via di ingresso; localizzazione	Subcutanea, intradermica; assenza negli organi linfoidi primari	Intravenosa, mucosale; presenza negli organi linfoidi primari
Presenza di adiuvanti	Antigeni con adiuvanti: stimolano i linfociti T helper	Antigeni senza adiuvanti: non sono immunogenici né tollerogenici
Caratteristiche delle APC	Livelli elevati di molecole costimolatorie	Bassi livelli di molecole costimolatorie e di citochine

La natura della cellula dendritica che presenta gli antigeni ai linfociti T è una discriminante importante della successiva risposta. Le cellule dendritiche che residedono negli organi linfoidi e nei tessuti non linfoidi possono presentare antigeni self ai linfociti T e mantenere la tolleranza. Le cellule dendritiche tissutali si trovano normalmente in uno stato di riposo (immaturo) ed esprimono un numero esiguo di molecole costimolatorie oppure non ne esprimono affatto. Tali APC possono presentare costantemente antigeni self senza inviare segnali di attivazione e i linfociti T

che riconoscono questi antigeni diventano anergici o si differenziano in linfociti T regolatori anziché linfociti effettori e di memoria. Al contrario, le cellule dendritiche che sono attivate dai microbi sono le principali APC per l'attivazione delle risposte dei linfociti T (vedi Cap. 6). Come vedremo più avanti, le infezioni e gli stati infiammatori locali possono attivare cellule dendritiche residenti, determinando un aumento dell'espressione di molecole costimolatorie, la rottura dei meccanismi di tolleranza e le reazioni autoimmuni contro gli antigeni tissutali. Le caratteristiche delle cellule dendritiche responsabili delle loro funzioni tollerogeniche non sono definite ma presumibilmente comprendono bassi livelli di espressione di molecole costimolatorie. Vi è un grande interesse nella manipolazione delle proprietà delle cellule dendritiche come strategia di potenziamento o inibizione delle risposte immunitarie per scopi terapeutici.

La nostra comprensione dei meccanismi che determinano il destino di un linfocita T in seguito al riconoscimento dell'antigene è incompleta. Le attuali conoscenze si fondano su modelli sperimentali basati sulla somministrazione esogena di antigeni self o sulla loro espressione mediante modelli transgenici. La sfida di questo settore è oggi la comprensione dei meccanismi che determinano lo stato tollerogenico degli antigeni self, normalmente espressi, soprattutto nell'uomo.

TOLLERANZA DEI LINFOCITI B

La tolleranza dei linfociti B è necessaria per mantenere la non responsività agli antigeni self timo-indipendenti, come i polisaccaridi e i lipidi, ma può anche svolgere un ruolo nella prevenzione delle risposte anticorpali verso gli antigeni proteici. Studi sperimentali hanno evidenziato diversi meccanismi mediante i quali l'incontro con l'antigene self può bloccare la maturazione e l'attivazione dei linfociti B.

Tolleranza centrale dei linfociti B

I linfociti B immaturi che riconoscono con elevata affinità un antigene self presente nel midollo osseo vengono eliminati oppure indotti a

modificare la loro specificità. Molte conoscenze sulla tolleranza centrale nei linfociti B derivano da studi condotti in modelli sperimentali (Fig. 15-9).

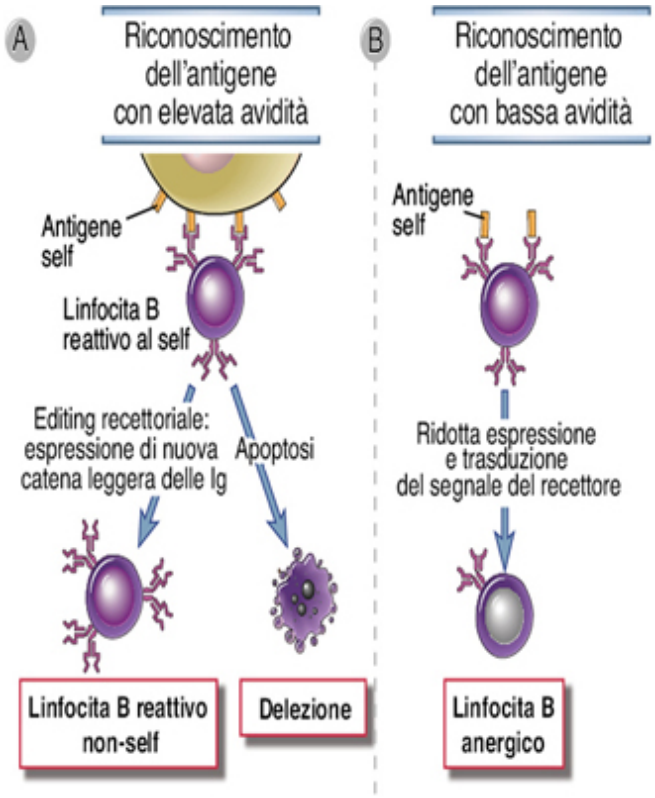


FIGURA 15-9 Tolleranza centrale dei linfociti B. I linfociti B immaturi, che riconoscono con elevata avidità nel midollo osseo gli antigeni self, muoiono per apoptosi o vengono indotti a modificare la specificità del loro recettore per l'antigene (editing recettoriale). Un debole riconoscimento dell'antigene self nel midollo osseo può portare all'anergia (inattivazione funzionale) dei linfociti B.

- ***Editing recettoriale.*** Il riconoscimento degli antigeni self presenti ad alte concentrazioni nel midollo e soprattutto degli antigeni multivalenti (che possono cioè legare e aggregare contemporaneamente più recettori per l'antigene) determina il cross-linking dei recettori per i linfociti B e l'innesco di un forte segnale di attivazione. Come spiegato nel Capitolo 8, in queste condizioni, i linfociti B riattivano i geni *RAG1* e *RAG2* e procedono a una nuova ricombinazione VJ nel locus della catena leggera κ delle Ig. Questo processo porta una sequenza V_κ, posta a monte della regione $V_\kappa J_\kappa$ già riarrangiata, a unirsi con una sequenza J_κ a valle. L'esone $V_\kappa J_\kappa$ autoreattivo, precedentemente riarrangiato, viene quindi eliminato e verrà espressa una catena leggera Ig dotata di nuova

specificità. Questo processo è chiamato **editing recettoriale** (vedi Cap. 8) e rappresenta un importante meccanismo per la definizione del repertorio di linfociti B maturi privo di cloni autoreattivi. Se il nuovo riarrangiamento non è produttivo, il riarrangiamento può procedere nel locus κ del secondo cromosoma. Nel caso in cui anche questo non sia produttivo, avranno inizio riarrangiamenti alla catena leggera λ. Un linfocita B che esprime una catena leggera λ di solito è una cellula che è stata sottoposta a editing recettoriale.

- ***Delezione.*** Se il processo di editing fallisce, i linfociti B immaturi autoreattivi vengono eliminati per apoptosi. I meccanismi legati alla delezione non sono completamente conosciuti.
- ***Anergia.*** Nel caso in cui il legame dell'antigene da parte del linfocita B immaturo sia debole (come nel caso degli antigeni solubili che non siano in grado di indurre il cross-linking dei recettori o di un legame a bassa affinità), i linfociti B fuoriescono dal midollo in condizioni anergiche. L'anergia è causata dall'inibizione dell'espressione del recettore per l'antigene o da un suo blocco funzionale.

Tolleranza periferica dei linfociti B

I linfociti B maturi che riconoscono gli antigeni self nei tessuti periferici in assenza di cellule T helper specifiche vengono inattivati o eliminati per apoptosi (Fig. 15-10). La costimolazione da parte dei linfociti T helper può mancare nel caso in cui queste cellule siano state delete o rese anergiche oppure nel caso in cui gli antigeni self siano di natura non proteica. Poiché gli antigeni self generalmente non scatenano risposte immunitarie innate, neanche i linfociti B saranno attivati attraverso i recettori del complemento o recettori che riconoscono i profili molecolari (PRR). Per questo motivo i linfociti B, come già visto per i linfociti T, non riceveranno alcun segnale di costimolazione e acquisiranno una condizione di tolleranza. I meccanismi di tolleranza periferica sono anche in grado di eliminare i cloni dei linfociti B autoreattivi generatisi casualmente durante il processo di mutazioni somatiche che ha luogo nei centri germinativi.

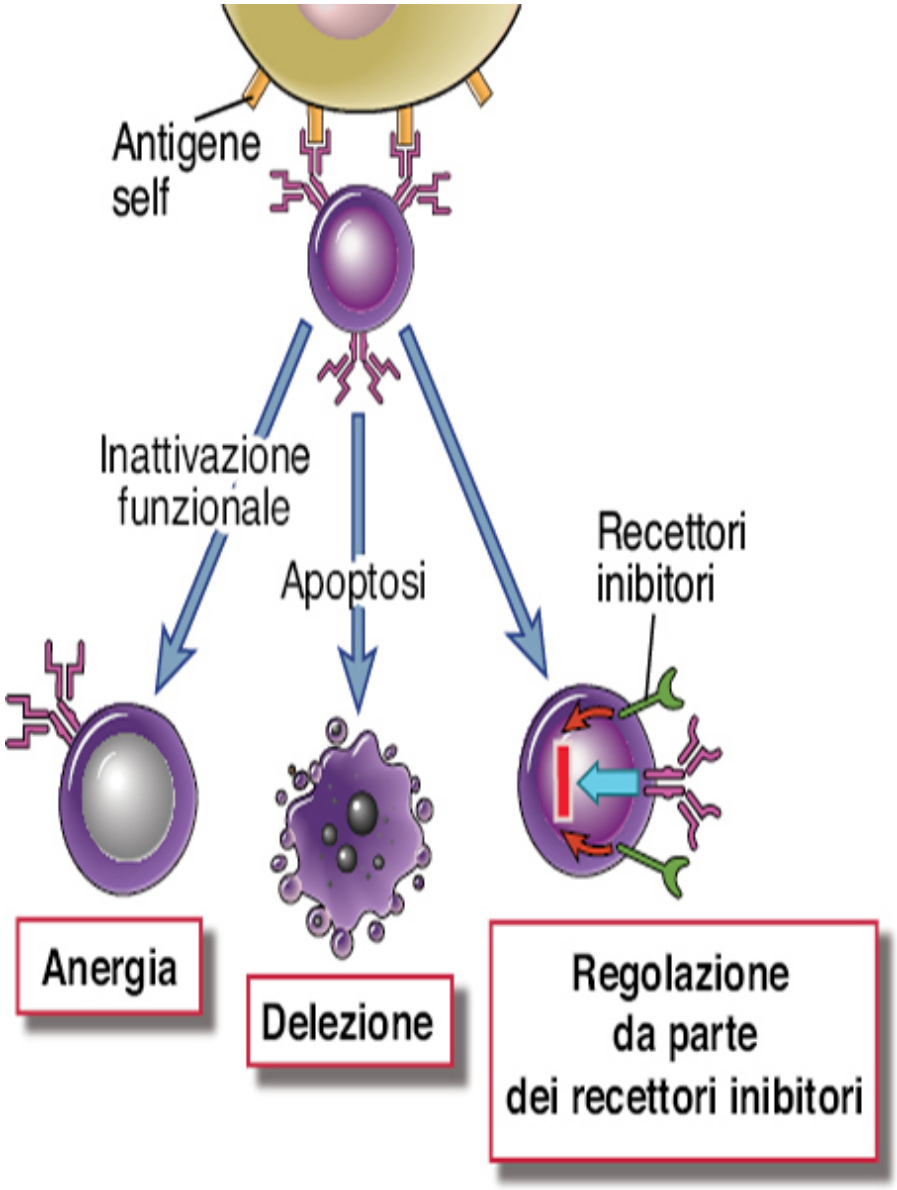


FIGURA 15-10 Tolleranza periferica dei linfociti B. I linfociti B che incontrano gli antigeni self nei tessuti periferici diventano anergici o muoiono per apoptosi. In alcune situazioni il riconoscimento degli antigeni self può attivare i recettori inibitori e, conseguentemente, bloccare l'attivazione dei linfociti B.

- ***Anergia e delezione.*** I linfociti B autoreattivi possono perdere la capacità di rispondere a successive stimolazioni, in seguito alla ripetuta attivazione da parte degli antigeni self. Queste cellule hanno un maggiore grado di dipendenza dai fattori di sopravvivenza e non riescono a competere con gli altri linfociti B naïve presenti nei follicoli linfoidi che necessitano di concentrazioni inferiori dei fattori

BAFF/BLys (vedi Cap. 11). Di conseguenza, questi linfociti B hanno una ridotta capacità di sopravvivere e vengono eliminati più rapidamente rispetto a quelli che non hanno incontrato gli antigeni self. Nei tessuti periferici, i linfociti B dotati di elevata affinità per gli autoantigeni possono anche andare incontro a morte per apoptosi attraverso la via mitocondriale.

L'elevato numero di mutazioni somatiche a cui vanno incontro i geni delle Ig nei centri germinativi comporta il rischio di di generare cellule autoreattive (vedi Cap. 12). In questo caso, i linfociti B autoreattivi possono essere eliminati dai linfociti T helper che esprimono FasL. Lo stesso meccanismo di uccisione è già stato descritto parlando dei linfociti T autoreattivi. L'inefficacia di questo meccanismo della tolleranza periferica dei linfociti B è coinvolto nelle risposte autoimmuni presenti nei modelli sperimentali murini in cui sono stati inattivati Fas o FasL e nei pazienti con ALPS (discussi precedentemente).

- ***Ruolo dei recettori inibitori.*** I linfociti B che riconoscono con bassa affinità gli antigeni self possono essere controllati grazie all'azione di alcuni recettori inibitori. La funzione di questi recettori è definire una soglia di attivazione che può essere raggiunta solo se il riconoscimento degli antigeni avviene in associazione con i segnali di costimolazione forniti dai linfociti T; condizioni che normalmente non si verificano in risposta agli antigeni self. Questo meccanismo di tolleranza periferica è stato dimostrato in modelli sperimentali murini in cui la condizione di autoimmunità è la conseguenza di difetti genetici della tirosina fosfatasi SHP-1 (*SH2-domain containing Phosphatases 1*), della tirosina chinasi Lyn e del recettore inibitorio CD22. I motivi ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*), presenti nella coda citoplasmatica del CD22, vengono fosforilati dalla chinasi Lyn e reclutano la fosfatasi SHP-1 responsabile nell'inibizione della trasduzione del segnale del recettore dei linfociti B. Non è tuttavia noto se e quando i recettori inibitori come il CD22 vengano attivati, tantomeno è nota l'identità dei loro ligandi naturali.

In questi anni le conoscenze sui meccanismi responsabili della tolleranza dei linfociti B e T hanno fatto grandi passi in avanti grazie all'utilizzo di animali

geneticamente modificati. L'utilizzo di queste conoscenze per comprendere i meccanismi che regolano la tolleranza agli antigeni self nell'uomo e le ragioni per cui tali meccanismi possono alterarsi provocando la comparsa di malattie autoreattive sono tra le aree di maggiore espansione della ricerca contemporanea.

TOLLERANZA VERSO GLI ANTIGENI PROTEICI NON SELF

Le modalità con cui un antigene non self viene somministrato possono indurre preferenzialmente la tolleranza piuttosto che una risposta immunitaria. La comprensione di come si possa indurre la tolleranza mediante la somministrazione dell'antigene è il punto nodale per poter sviluppare una tolleranza antigene-specifica come strategia terapeutica per le malattie autoimmuni. In generale, la somministrazione di antigeni proteici per via cutanea in combinazione con gli adiuvanti favorisce la risposta immune, mentre dosi elevate di antigene somministrate in assenza di adiuvanti tendono a indurre tolleranza. La spiegazione più probabile di questo fenomeno è che gli adiuvanti stimolano l'espressione di molecole costimolatorie sulle APC e, in assenza di questi secondi segnali, i linfociti T, che riconoscono l'antigene, possono diventare anergici, morire o differenziarsi in cellule regolatrici. Oltre alla via di somministrazione, le caratteristiche dell'antigene stesso possono influenzare l'equilibrio tra immunità e tolleranza (vedi Tab. 15-1).

La somministrazione orale di un antigene proteico in genere porta a una marcata soppressione della risposta sistemica (umorale e cellulare) e a una successiva immunizzazione con lo stesso antigene. Questo fenomeno, che prende il nome di **tolleranza orale**, è stato trattato nel Capitolo 14.

MECCANISMI CHE REGOLANO L'AUTOIMMUNITÀ

La possibilità che il sistema immunitario possa riconoscere gli antigeni self e causare un danno tissutale fu considerata dagli immunologi sin dal momento in cui fu affermato il concetto di specificità per gli antigeni. All'inizio del Novecento, Paul Ehrlich coniò l'espressione piuttosto melodrammatica di *horror autotoxicus* per indicare reazioni immunitarie dannose per il self. L'autoimmunità è una causa importante di malattia e si stima che negli Stati Uniti colpisca dal 2 al 5% della popolazione. Il termine autoimmunità è spesso utilizzato erroneamente per indicare qualsiasi malattia in cui una risposta immunitaria sia accompagnata da un danno tissutale, anche in assenza di evidenze che indichino gli antigeni self come i responsabili della sua patogenesi. Dato che l'infiammazione rappresenta spesso un aspetto preponderante, queste malattie vengono talvolta raggruppate sotto il nome di *malattie infiammatorie immunomediate*, il che tuttavia non implica che la risposta patologica sia effettivamente diretta verso gli antigeni self (vedi Cap. 19).

Le domande fondamentali che rimangono ancora oggi senza risposta riguardano le ragioni dell'attivazione dei linfociti autoreattivi e del mancato funzionamento della tolleranza. La risposta a queste domande costituisce una delle principali sfide dell'immunologia moderna e rappresenta il punto di partenza per comprendere l'eziologia e la patogenesi delle malattie autoimmuni. Negli ultimi vent'anni, le nostre conoscenze sono molto progredite, principalmente grazie allo sviluppo di una serie di modelli animali, all'identificazione di geni che possono predisporre all'autoimmunità e al miglioramento delle metodiche per analizzare le risposte immunitarie nell'uomo. Questi studi hanno messo in evidenza molti aspetti fondamentali per la comprensione delle malattie autoimmuni.

I fattori che contribuiscono allo sviluppo delle malattie autoimmuni sono la predisposizione genetica e i fattori ambientali scatenanti, come gli episodi infettivi e le lesioni tissutali locali. I geni coinvolti possono alterare i meccanismi di tolleranza al self, mentre le infezioni e la necrosi tissutale promuovono l'afflusso e l'attivazione di linfociti autoreattivi responsabili del danno tissutale (Fig. 15-11). Questi due fattori possono anche alterare il modo in cui gli antigeni self vengono presentati al sistema immunitario, determinando la rottura della tolleranza e l'attivazione dei linfociti autoreattivi. Il ruolo svolto da questi fattori nello sviluppo delle malattie autoimmuni verrà discusso più avanti. Altri fattori come alterazioni nel

microbioma dell'ospite e variazioni epigenetiche nelle cellule dell'immunità possono svolgere ruoli importanti nella patogenesi, ma gli studi in merito sono ancora nelle fasi iniziali.

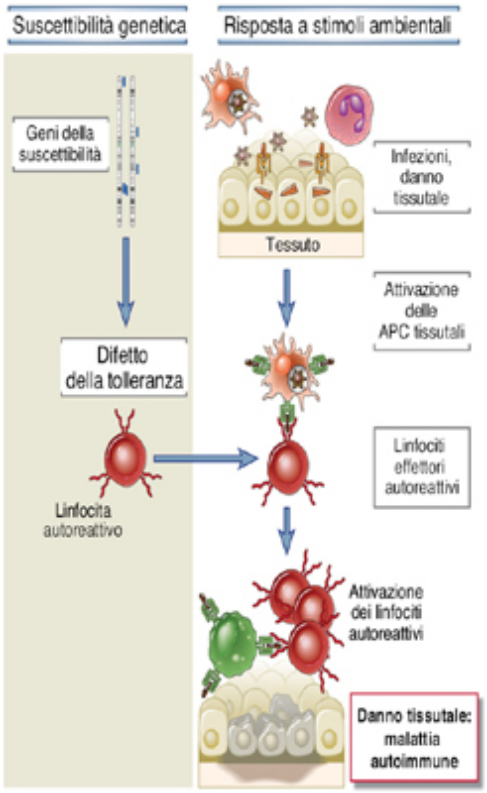


FIGURA 15-11 Meccanismi patogenetici dell'autoimmunità. In questa ipotesi di malattia autoimmune organo-specifica causata dai linfociti T, vari loci genici possono predisporre allo sviluppo della malattia influenzando il mantenimento della tolleranza. Elementi ambientali scatenanti, come le infezioni e altro, promuovono l'afflusso nei tessuti e l'attivazione dei linfociti T autoreattivi, con conseguente danno tissutale.

Caratteristiche generali delle malattie autoimmuni

Le malattie autoimmuni presentano numerose caratteristiche generali che sono rilevanti ai fini della definizione dei meccanismi sottostanti.

- ***Le malattie autoimmuni possono essere sistemiche o localizzate in un determinato organo (organo-specifiche), a seconda della distribuzione degli antigeni self che vengono riconosciuti.*** Per esempio, la formazione in circolo di immunocomplessi composti da nucleoproteine self e anticorpi specifici causa tipicamente malattie sistemiche, come il LES. Per contro, le risposte anticorpali o dei linfociti T contro gli

antigeni self con ridotta distribuzione tissutale causano malattie organo-specifiche, come la miastenia gravis, il diabete mellito di tipo 1 e la sclerosi multipla.

- ***Nelle malattie autoimmuni, vari meccanismi effettori sono responsabili del danno tissutale.*** Questi meccanismi comprendono la formazione in circolo di immunocomplessi e di autoanticorpi e lo sviluppo di linfociti T autoreattivi e saranno discussi nel Capitolo 19. Le caratteristiche cliniche e patologiche della malattia sono di solito determinate dalla natura della risposta autoimmune dominante.
- ***Le malattie autoimmuni tendono a essere croniche, progressive e ad autoperpetuarsi.*** Queste caratteristiche sono legate al fatto che gli antigeni self che scatenano tali reazioni sono persistenti e una volta che la reazione ha inizio vengono attivati diversi meccanismi di amplificazione che perpetuano la risposta. Inoltre, le risposte che si sono attivate contro uno specifico antigene self possono danneggiare i tessuti, determinando il rilascio e l'alterazione di altri antigeni tissutali che portano all'attivazione di linfociti specifici per tali antigeni, i quali inaspriscono la malattia. Questo fenomeno è conosciuto come "epitope spreading" e può spiegare i meccanismi che determinano la cronicizzazione della malattia autoimmune una volta che si sia instaurata.

Anomalie immunologiche che determinano autoimmunità

L'autoimmunità è il risultato della combinazione di tre principali aberrazioni immunologiche.

- ***Carenza di tolleranza o regolazione. L'inefficienza dei meccanismi di tolleranza al self nei linfociti T o B, che determina uno squilibrio tra l'attivazione e il controllo dei linfociti, rappresenta la causa sottostante tutte le malattie autoimmuni.*** La possibilità di sviluppare autoimmunità esiste in ogni individuo poiché alcune delle specificità recettoriali generate casualmente nei cloni linfocitari possono riconoscere antigeni self e i numerosi antigeni self sono immediatamente accessibili ai linfociti. Come spiegato in precedenza, la tolleranza agli antigeni self è di norma regolata da processi di selezione che prevengono la maturazione di linfociti specifici per

antigeni self e da meccanismi che inattivano o inducono alla morte i linfociti autoreattivi che riescono a maturare. La perdita di tolleranza al self può subentrare se i linfociti autoreattivi non sono eliminati o inattivati durante o dopo il processo di maturazione o se le APC sono attivate in modo tale che antigeni self siano presentati al sistema immunitario in ambiente immunogenico. I modelli sperimentali, insieme a studi limitati su soggetti umani, hanno dimostrato che uno qualsiasi dei seguenti meccanismi può contribuire alla perdita di tolleranza al self:

  - Difetti di eliminazione (selezione negativa) dei linfociti T o B o editing recettoriale nei linfociti B durante la maturazione negli organi linfoidi primari.
  - Carenza o difetti funzionali dei linfociti T regolatori.
  - Difetto di apoptosi dei linfociti autoreattivi maturi.
  - Inadeguato funzionamento dei recettori inibitori.

- ***Anomala presentazione degli antigeni self.*** Le anomalie possono consistere nell'aumentata espressione e persistenza degli antigeni self, che in condizioni normali sarebbero eliminati, o variazioni strutturali in questi antigeni causate da modificazioni enzimatiche, da danni o lesioni cellulari. Se queste alterazioni determinano l'esposizione di nuovi epitopi antigenici che non sono presenti normalmente, il sistema immunitario può mancare di tolleranza e consentire, di conseguenza, lo sviluppo di risposte anti-self.
- ***Infiammazione o iniziale risposta immunitaria.*** Come abbiamo spiegato nei precedenti capitoli, la risposta immunitaria innata è un forte stimolo per la successiva attivazione dei linfociti e la generazione di risposte immunitarie adattative. Le infezioni o una lesione cellulare scatenano reazioni immunitarie innate locali e infiammazione. Tali reazioni possono contribuire allo sviluppo di malattie autoimmuni, verosimilmente mediante attivazione delle APC, che soverchia i meccanismi regolatori e determina un'eccessiva attivazione dei linfociti T.

Recentemente, il ruolo dei linfociti T nelle risposte autoimmuni ha attratto un forte interesse per due principali ragioni. In primo luogo, i linfociti T helper svolgono un ruolo chiave in tutte le risposte verso antigeni proteici e

la maggioranza degli antigeni self coinvolti nelle malattie autoimmuni sono proteine. In secondo luogo, numerose malattie autoimmuni sono geneticamente associate all'aplotipo MHC (HLA nell'uomo) visto che la funzione delle molecole MHC è quella di presentare gli antigeni peptidici ai linfociti T. La mancata tolleranza al self nei linfociti T può determinare lo sviluppo di malattie autoimmuni in cui il danno tissutale è causato da reazioni immunitarie cellulo-mediate. Le anomalie a carico dei linfociti T helper possono, inoltre, determinare la produzione di autoanticorpi, poiché i linfociti T helper sono necessari ai fini della produzione di anticorpi a elevata affinità contro gli antigeni proteici.

Nel prossimo paragrafo descriveremo i principi generali della patogenesi delle malattie autoimmuni, ponendo particolare enfasi sui fattori genetici e su altri fattori, come le infezioni, che contribuiscono al loro sviluppo. Le caratteristiche e i meccanismi patogenetici di alcune malattie autoimmuni rappresentative sono descritti nel Capitolo 19.

Fattori genetici nell'autoimmunità

Fin dai primi studi clinici e sperimentali, è risultato evidente che queste malattie presentano un'importante componente genetica. Per esempio, il diabete di tipo 1 mostra una frequenza del 35-50% nei gemelli monozigoti e del 5-6% nei gemelli eterozigoti e vi sono simili evidenze anche per altre patologie. Studi di trasmissione familiare e di analisi dell'intero genoma, insieme agli sforzi di sequenziamento su larga scala, hanno fornito maggiori informazioni sui geni coinvolti nello sviluppo delle malattie autoimmuni e delle malattie infiammatorie croniche. Questi studi hanno permesso di definire alcune caratteristiche generali sulla loro suscettibilità genetica.

La maggior parte delle malattie autoimmuni è poligenica e i soggetti che ne sono affetti ereditano molteplici polimorfismi che contribuiscono a definire una predisposizione genetica per la malattia. Questi geni agiscono di concerto con fattori ambientali. Normalmente, i geni identificati non sono specifici per una particolare malattia e il polimorfismo di un singolo gene può essere coinvolto nella suscettibilità di un individuo a molteplici patologie autoimmuni. Altri loci genici sono invece associati a specifiche malattie, suggerendo che in questo caso i geni siano implicati nel danno d'organo o possano influenzare i linfociti autoreattivi con determinate

specificità. Ogni polimorfismo dà un piccolo contributo allo sviluppo di una particolare malattia autoimmune ed è generalmente presente anche negli individui sani, ma a una frequenza minore rispetto a quella osservata nei pazienti. Si ipotizza che quando diversi poliformismi vengono coereditati, questi contribuiscano nel loro insieme alla patogenesi della malattia. La comprensione dell'interazione tra la componente genetica e quella ambientale rappresenta una delle attuali sfide in questo settore.

Di seguito saranno descritti i geni meglio caratterizzati per il loro coinvolgimento in patologie autoimmuni e la nostra attuale comprensione di come essi possano contribuire alla perdita della tolleranza al self.

Alleli MHC e autoimmunità

Fra i tutti i geni studiati, l'associazione con i geni MHC è la più forte. Infatti, in molte malattie autoimmuni, come il diabete di tipo 1, sono stati identificati 20-30 geni associati alla patologia; nella maggior parte dei casi, il locus HLA da solo contribuisce per almeno la metà della suscettibilità genetica. La tipizzazione HLA di vaste coorti di pazienti affetti da diverse malattie autoimmuni ha mostrato come alcuni alleli si presentino con una maggiore frequenza rispetto alla popolazione normale. Tali studi permettono di calcolare l'*odds ratio* (o limiti di confidenza), in altre parole la probabilità di sviluppare una malattia negli individui che ereditano determinati alleli HLA (spesso chiamato rischio relativo) (Tab. 15-2). L'associazione più forte si ha tra la spondilite anchilosante, una malattia infiammatoria delle articolazioni vertebrali, presumibilmente su base autoimmune, e l'allele di classe I HLA-B27. Gli individui che sono HLA-B27 positivi hanno una probabilità che è più di 100 volte superiore di sviluppare spondilite anchilosante rispetto agli individui che sono B27-negativi; tuttavia, non si conoscono né i meccanismi né le ragioni di questa associazione. Recentemente, è stata rivolta molta attenzione all'associazione degli alleli di classe II HLA-DR e HLA-DQ con le malattie autoimmuni, soprattutto in considerazione del fatto che le molecole MHC di classe II sono coinvolte nella selezione e nell'attivazione dei linfociti T $CD4^+$ ed è noto che questa sottopopolazione linfocitaria regola le risposte umorali e cellulari agli antigeni proteici.

L’associazione degli alleli HLA alle malattie autoimmuni ha molte caratteristiche importanti.

TABELLA 15-2 Associazione degli alleli HLA con le malattie autoimmuni

Malattia	Allele HLA	*Odds Ratio*[1]
Artrite reumatoide	*DRB1, 1 SE allele*[3]	4
(positivi per anticorpi anti-CCP)[2]	*DRB1, 2 SE allele*[3]	12
Diabete di tipo 1	*Aplotipo DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201*	4
	*Aplotipo DRB1*0401-DQA1*0301-DQB1*0302*	8
	*Eterozigosi DRB1*0301/0401*	35
Sclerosi multipla	*DRB1*1501*	3
Lupus eritematoso sistemico	*DRB1*0301*	2
	*DRB1*1501*	1,3
	*DRB1*1501*	1,3
Spondilite anchilosante	*B*27 (soprattutto B*2705 e *2702)*	100-200
Malattia celiaca	*Aplotipo DQA1*0501-DQB1*0201*	7

[1] L’*odds ratio* rappresenta il valore dell’aumento di rischio di malattia associato all’ereditarietà di alcuni alleli HLA. I dati sono relativi a popolazioni di origine europea. Gli alleli di singoli geni MHC (per esempio DRB1) sono indicati da 4 cifre (per esempio 0301), in base alla tipizzazione sierologica e molecolare.

[2] Anticorpi anti-CCP diretti contro peptidi citrullinati ciclici. Dati ottenuti da pazienti positivi per questi anticorpi nel siero.

[3] SE (*Shared Epitope*) si riferisce a epitopi condivisi, così chiamati perché si tratta di una sequenza consenso nella proteina DRB1 (posizioni 70-74) presente in molteplici alleli DRB1
(*Per gentile concessione del Dr. Michelle Fernando, Kings College, London.*)

- Un’associazione tra l’HLA e la malattia può essere identificata mediante la tipizzazione sierologica di un locus HLA, ma la reale associazione può essere con altri alleli legati all’allele tipizzato ed ereditati congiuntamente. Per esempio, gli individui con un particolare allele HLA-DR (come DR1) hanno una maggiore probabilità di

ereditare un particolare allele HLA-DQ, poniamo DQ2, di quella di ereditare questi alleli separatamente e casualmente. Questo tipo di ereditarietà è un esempio di quello che viene definito *linkage disequilibrium*, cioè segregazione di due loci che si trovano su cromosomi diversi. Con la tipizzazione dell'HLA si può riscontrare che una determinata malattia è associata all'allele DR1, ma in realtà la malattia è associata all'allele DQ2 coereditato. Questa osservazione richiama il concetto di *aplotipi HLA estesi*, che si riferisce a quei geni, sia appartenenti al complesso HLA sia a esso adiacenti, che tendono a essere ereditati in blocco.

- In molte malattie autoimmuni, i polimorfismi dei nucleotidi associati alla malattia codificano per gli aminoacidi presenti nella tasca che alloggia il peptide della molecola MHC. Questa osservazione non è del tutto sorprendente dal momento che i residui polimorfi delle molecole MHC sono localizzati all'interno e nelle immediate vicinanze di tali tasche e che la loro struttura costituisce l'elemento cruciale che condiziona le due principali funzioni delle molecole MHC: la presentazione dell'antigene e il riconoscimento da parte del linfocita T (vedi Cap. 6).
- È importante notare che le sequenze HLA associate a malattia sono presenti anche in individui sani. Infatti, se tutti i soggetti che esprimono un particolare HLA associato a una determinata malattia autoimmune venissero monitorati, si potrebbe osservare che la maggior parte di questi non svilupperà la malattia. Quindi, l'espressione di un particolare gene HLA non rappresenta di per sé la causa di una malattia autoimmune, ma uno dei fattori che contribuiscono all'autoimmunità.

Le ragioni per cui particolari malattie autoimmuni sono associate all'ereditarietà di alcuni alleli MHC non sono ancora note. Nelle malattie in cui specifici alleli MCH aumentano il rischio di malattia, le molecole MHC in questione potrebbero essere coinvolte nella presentazione di un peptide self a linfociti T patogenetici. Nel caso in cui la presenza di un particolare allele risulti protettiva, è possibile che questo allele sia coinvolto nella selezione negativa di linfociti T con specificità potenzialmente patogenetica o nello sviluppo di linfociti T regolatori.

Polimorfismi in geni diversi dall'HLA e autoimmunità

Studi di associazione hanno identificato geni e regioni cromosomiche, in cui si sospetta la presenza di geni ancora da identificare, associati a malattie autoimmuni. La tecnica analitica degli studi di associazione "genome-wide" ha portato alla presunta identificazione di polimorfismi nucleotidici (varianti) di numerosi geni che sono associati a malattie autoimmuni e questo dato è stato considerevolmente approfondito da studi sul sequenziamento del genoma condotti più di recente (Tabella 15-3) Prima di passare alla trattazione dei geni che hanno ottenuto una sicura validazione, è importante ricapitolare alcune caratteristiche generali.

TABELLA 15-3 Sinossi dei polimorfismi genetici non-HLA associati a malattie autoimmuni

Gene di interesse	Funzione	Malattia
Geni coinvolti nelle risposte immunologiche		
PTPN22	Proteina tirosina fosfatasi; ruolo nella trasduzione del segnale dei recettori dei linfociti T e B	AR, DT1, IBD
CD2/CD58	Costimolazione dei linfociti T	AR, SM
IL23R	Componente del recettore di IL-23; ruolo nella generazione ed espansione dei linfociti T_H17	IBD, PS, SA
IL10	Inibisce l'espressione delle molecole costimolatorie, delle molecole MHC, dell'IL-12 nelle cellule dendritiche; inibisce le risposte T_H1	IBD, LES, DT1
CTLA4	Recettore inibitorio dei linfociti T, molecola effettrice dei linfociti T regolatori	DT1, AR
IL2/IL21	Fattori di crescita e differenziazione dei linfociti T; l'IL-2 è coinvolta nella sopravvivenza dei linfociti T regolatori	IBD, MC, AR, DT1, SM

IL12B	Subunità p40 di IL-12 (citochina che attiva le cellule T_H1)	IBD, PS
BLK	Tirosina chinasi dei linfociti B, coinvolta nell'attivazione dei linfociti B	LES, AR
IL2RA	Catena α del recettore di IL-2 (CD25); ruolo nell'attivazione e sopravvivenza dei linfociti T	SM, DT1
Geni coinvolti nella risposta ai microrganismi		
NOD2	Sensore citoplasmatico dei batteri	IBD
ATG16	Autofagia (degradazione dei microrganismi, mantenimento dell'integrità delle cellule epiteliali)	IBD
IRF5, IFIH1	Risposta dell'interferone di tipo I ai virus	LES
AR, artrite reumatoide; DT1, diabete di tipo 1; IBD (*Inflammatory Bowel Disease*), malattia infiammatoria dell'intestino; LES, lupus eritematoso sistemico; MC, malattia celiaca; PS, psoriasi; SA, spondilite anchilosante; SM, sclerosi multipla. (*Dati ottentuti da: Zenewicz L, Abraham C, Flavell RA, and Cho J: Unraveling the genetics of autoimmunity.* Cell *140:791-797, 2010; per gentile concessione dell'editore*.)		

- È probabile che combinazioni di una serie polimorfismi genetici ereditati possa interagire con fattori ambientali per indurre anomalie immunologiche responsabili di fenomeni autoimmuni. Tuttavia, vi sono esempi di rare varianti genetiche che singolarmente contribuiscono in misura molto maggiore a particolari malattie.
- Molti polimorfismi associati alle malattie autoimmuni si trovano in geni che influenzano lo sviluppo e la regolazione delle risposte immunitarie. Questa conclusione, anche se prevedibile, ha permesso di confermare la validità dell'approccio utilizzato.
- Gli studi di associazione genome-wide hanno messo in evidenza che i polimorfismi possono sia avere un ruolo protettivo sia favorire l'incidenza di una malattia autoimmune.
- I polimorfismi identificati spesso si collocano in regioni non codificanti. Questo dato suggerisce che gran parte dei polimorfismi

possa avere un ruolo nella regolazione dell'espressione delle proteine codificate.

Descriveremo ora alcuni geni associati a malattie autoimmuni identificati nell'uomo.

- ***PTPN22.*** Una variante della proteina tirosina fosfatasi PTPN22, in cui l'arginina in posizione 620 è sostituita da triptofano, è associata all'artrite reumatoide, diabete di tipo 1, tiroidite autoimmune e altre malattie autoimmuni. La variante associata alla malattia causa complesse alterazioni della trasduzione del segnale in molteplici tipi cellulari del sistema immunitario. In che modo esattamente tali alterazioni determinino autoimmunità non è noto.
- ***NOD2.*** I polimorfismi di questo gene sono associati al morbo di Crohn, una malattia infiammatoria cronica dell'intestino. *NOD2* è un sensore citoplasmatico dei peptoglicani della parete batterica (vedi Cap. 4) ed è espresso da molti tipi cellulari, inclusi l'epitelio intestinale. Si presume che i polimorfismi ne riducano la funzionalità, compromettendo la sua capacità di attivare un'efficace difesa contro i microrganismi intestinali. Di conseguenza, i microrganismi sarebbero in grado di oltrepassare l'epitelio intestinale e attivare una reazione infiammatoria cronica, una caratteristica peculiare di questa malattia (vedi Cap. 14).
- ***Insulina.*** Il diabete di tipo 1 è associato ai polimorfismi del gene dell'insulina che codificano per la presenza di sequenze ripetute. Tali polimorfismi potrebbero ridurre l'espressione timica dell'insulina e incidere negativamente sui meccanismi di eliminazione dei linfociti T specifici per l'insulina. Queste cellule possono pertanto sopravvivere e fare parte del repertorio dei linfociti T maturi, attaccando le cellule β che producono insulina e causando il diabete.
- ***CD25.*** I polimorfismi a carico del gene *CD25*, la catena α del recettore dell'IL-2, sono associati alla sclerosi multipla, al diabete di tipo 1 e ad altre malattie autoimmuni. Queste alterazioni del CD25 incidono verosimilmente sulla generazione e sul funzionamento dei linfociti T regolatori, anche se manca una chiara correlazione causale tra alterazioni di CD25, difetti dei linfociti T regolatori e la malattia autoimmune.

- ***Recettore dell'IL-23 (IL-23R).*** Alcuni polimorfismi nel recettore per IL-23 sono associati a un'aumentata suscettibilità alla malattia infiammatoria intestinale e a psoriasi cutanea, mentre altri polimorfismi proteggono dallo sviluppo di tali patologie. IL-23 è una delle citochine coinvolte nello sviluppo dei linfociti T_H17, che stimolano le reazioni infiammatorie (vedi Cap. 10).
- ***ATG16L1.*** Un polimorfismo "con perdita di funzione" che sostituisce una treonina in posizione 300 con un'alanina causa un difetto funzionale in questo gene ed è associato a malattia infiammatoria intestinale. ATG16L1 è una delle famiglie di proteine coinvolte nell'autofagia, una risposta cellulare alle infezioni, alla privazione di nutrienti e ad altre forme di stress cellulare. Nell'ambito di questo processo, la cellula mangia i suoi stessi organelli per fornire substrati metabolici per la produzione energetica oppure una cellula infettata cattura i microbi intracellulari e li indirizza verso i lisosomi. L'autofagia è importante per il mantenimento dell'integrità delle cellule epiteliali intestinali o nell'eliminazione dei microbi che sono entrati nel citoplasma. Inoltre, l'autofagia è un meccanismo per veicolare componenti citosoliche verso molecole MHC di classe II nelle cellule che presentano l'antigene. Un allele di suscettibilità *ATG16L1* codifica per una proteina che viene degradata più rapidamente in condizioni di stress cellulare e questo comporta una riduzione nell'eliminazione dei microbi intracellulari attraverso il processo di autofagia. In che modo questo polimorfismo contribuisca allo sviluppo di malattia infiammatoria intestinale non è noto.

Nonostante siano note numerose associazioni genetiche con malattie autoimmuni, la sfida per correlare i polimorfismi genetici alla patogenesi delle patologie è tuttora in corso. Inoltre, è possibile che l'espressione genica venga regolata anche da alterazioni epigenetiche, contribuendo in tal modo allo sviluppo della malattia. Tuttavia, questa evenienza deve ancora essere dimostrata.

Anomalie ereditarie monogeniche (mendeliane) che causano autoimmunità

Studi condotti in modelli animali e in sperimentazioni cliniche hanno permesso l'identificazione di diversi geni in grado di regolare la tolleranza agli antigeni self (Tab. 15-4). A differenza dei polimorfismi complessi descritti precedentemente, questi difetti, presenti a livello di un singolo gene, sono esempi di malattie mendeliane in cui la mutazione è rara ma ha un'alta penetranza e quindi causa l'insorgenza della malattia nella maggior parte degli individui che ne sono portatori. Molti di questi geni sono già stati menzionati precedentemente in questo capitolo quando si sono trattati i meccanismi di tolleranza periferica dei linfociti T; la loro identificazione ha fornito preziose informazioni sull'importanza di alcuni aspetti della tolleranza, sebbene essi siano associati a malattie autoimmuni rare. I geni in questione sono noti per essere coinvolti nei meccanismi di tolleranza centrale (*AIRE*), generazione di linfociti T regolatori (*FOXP3*, *IL2*, *IL2R*), anergia e funzione dei linfociti T regolatori (*CTLA4*) e la delezione dei linfociti T e B nei tessuti periferici (*Fas*, *FasL*). Descriveremo ora due ulteriori geni associati a malattie autoimmuni nell'uomo.

TABELLA 15-4 Esempi di mutazioni monogeniche che causano autoimmunità

Gene	Fenotipo del topo geneticamente modificato o knockout	Meccanismo di difetto della tolleranza	Malattia umana?
AIRE	Degenerazione degli organi endocrini causata da anticorpi e linfociti	Difetto della tolleranza centrale	APS
C4	LES	Difetto di rimozione degli immunocomplessi; difetti della tolleranza dei linfociti B?	LES
CTLA4	Linfoproliferazione; infiltrato T in molteplici organi, specie nel cuore; letale in 3-4 settimane	Difetto di anergia dei linfociti T $CD4^+$; difetto funzionale dei linfociti T regolatori	Polimorfismi di CTLA-4 associati a varie malattie autoimmuni
Fas/FasL	Anticorpi anti-DNA e altri autoanticorpi; nefrite da immunocomplessi; artrite; linfoproliferazione	Difetto di eliminazione dei linfociti B anergici autoreattivi; ridotta	ALPS

		eliminazione dei linfociti T $CD4^+$ maturi	
FoxP3	Infiltrazione linfocitaria multiorgano, dimagrimento	Deficit dei linfociti T regolatori	IPEX
IL2, IL2Rα/β	Malattia intestinale infiammatoria; autoanticorpi antieritrociti e anti-DNA	Difetto dello sviluppo, della sopravvivenza e della funzione dei linfociti T regolatori	Sconosciuta
SHP1	Autoanticorpi multipli	Mancanza di regolazione negativa di linfociti B	Sconosciuta

AIRE (*AutoImmune Regulator Gene*), gene regolatore di autoimmunità; IL-2, interleuchina 2; ALPS (*Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome*), sindrome autoimmune linfoproligenativa; APS (*Autoimmune Polyendrocrine Syndrome*), sindrome autoimmune poliendocrina; IPEX (*Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome*), disregolazione immune, patologia poliendocrina, enteropatia, sindrome legata al cromosoma X; SHP-1 (*SH2-containing phosphatase*), fosfatasi-1 contenente SH2; LES, lupus eritematoso sistemico.

- ***Geni che codificano per le proteine del complemento***. Il deficit di numerose proteine del complemento, quali C1q, C2 e C4 (vedi Cap. 13), è associato a malattie autoimmuni simili al LES. È probabile che il deficit di rimozione degli immunocomplessi circolanti e dei corpi apoptotici nei tessuti, dovuto all'assenza dei fattori del complemento, determini il loro accumulo e una conseguente persistenza degli antigeni.
- ***FcγRIIB***. Un polimorfismo responsabile della mutazione di un'isoleucina in una treonina nel dominio transmembrana di questo recettore Fc con attività inibitoria (vedi Cap. 12) è associato a LES. Questa osservazione è confermata in modelli murini in cui è stata operata l'eliminazione genetica di questo recettore. La probabile causa di questa malattia è da imputare alla mancanza del meccanismo di feedback negativo durante l'attivazione dei linfociti B.

Ruolo delle infezioni nell'autoimmunità

Le infezioni virali e batteriche possono contribuire allo sviluppo e all'esacerbazione delle malattie autoimmuni. Nell'uomo e in alcuni modelli

animali l’insorgenza di malattie autoimmuni è spesso associata o preceduta da eposidi infettivi. Nella maggior parte dei casi, il microrganismo infettivo non è direttamente presente nei tessuti interessati e, spesso, non è neppure presente al momento in cui si sviluppa il quadro di autoimmunità. Quindi, le lesioni non sono dovute all’agente infettivo in sé, ma derivano dalla risposta immunitaria dell’ospite scatenata o alterata dal microbo.

Le infezioni possono favorire l’autoimmunità attraverso due principali meccanismi (Fig. 15-12).

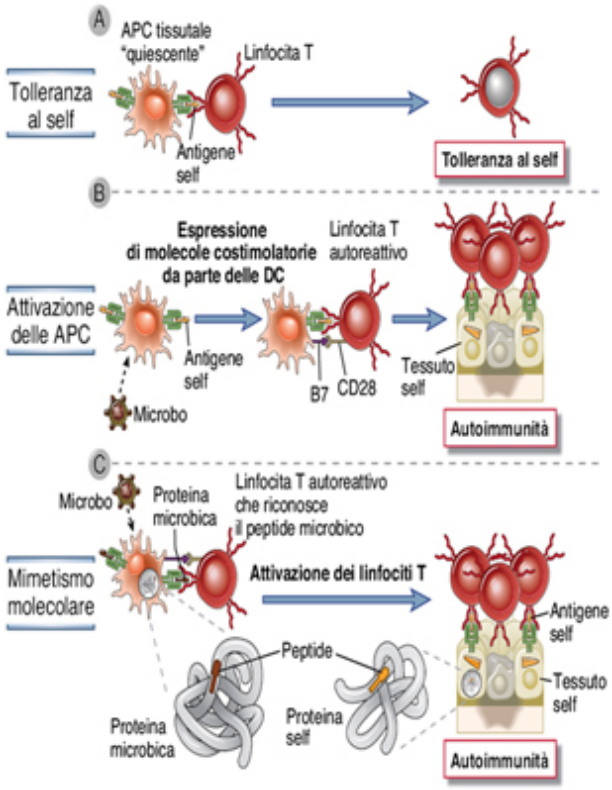


FIGURA 15-12 Ruolo delle infezioni nello sviluppo delle risposte autoimmuni. A. Normalmente, l’incontro di un linfocita T maturo autoreattivo con un antigene self presentato da un’APC tissutale immatura, priva di molecole costimolatorie, determina la tolleranza periferica mediante anergia. (Gli altri possibili meccanismi di tolleranza al self non vengono qui mostrati.) **B.** I microbi possono attivare l’espressione di molecole costimolatorie da parte delle APC e questo può portare all’attivazione dei linfociti T autoreattivi. **C.** Alcuni antigeni microbici possono cross-reagire con gli antigeni self (mimetismo molecolare); ne consegue che le risposte immunitarie dirette inizialmente contro i microbi possono attivare i linfociti T autoreattivi.

- Le infezioni a carico di un particolare tessuto possono promuovere l’attivazione locale dell’immunità innata, che comporta il reclutamento tissutale dei leucociti e l’attivazione delle APC. Queste ultime

esprimono molecole costimolatorie e secernono citochine in grado di attivare i linfociti T, con la conseguente rottura della tolleranza T verso gli antigeni self. Pertanto, l'infezione causa l'attivazione non specifica dei linfociti T; questo tipo di risposta viene chiamato attivazione bystander, ovvero delle cellule limitrofe. L'importanza del ruolo svolto dall'espressione aberrante delle molecole costimolatorie è suggerita dall'osservazione sperimentale che l'immunizzazione con antigeni self in presenza di forti adiuvanti (che mimano i microrganismi) dà luogo alla rottura della tolleranza e allo sviluppo di malattie autoimmuni. In altri modelli sperimentali, se un antigene virale viene espresso localmente in un tessuto, come per esempio le cellule β delle insule pancreatiche, questo induce la tolleranza nei linfociti T. L'infezione sistemica dello stesso virus causa tuttavia la rottura della tolleranza e l'uccisione delle cellule che producono insulina.

I microbi possono anche legare i recettori TLR espressi dalle DC, con conseguente produzione di citochine che attivano i linfociti, o dei TLR espressi dai linfociti B autoreattivi, con produzione di autoanticorpi. Il ruolo dei TLR nell'attivazione della risposta autoreattiva è stato dimostrato sperimentalmente in un modello murino di LES.

- Gli agenti infettivi possono contenere antigeni che cross-reagiscono con gli antigeni self, per cui la risposta verso i microbi può determinare risposte contro gli antigeni self. Questo fenomeno è definito **mimetismo molecolare** perché gli antigeni del microrganismo cross-reagiscono con, ossia mimano, gli antigeni self. Un esempio di questo fenomeno è la febbre reumatica, che si sviluppa in seguito a infezioni da streptococco ed è causata da anticorpi antistreptococco che cross-reagiscono con le proteine del miocardio. Questi anticorpi si depositano nel cuore e causano la miocardite. L'analisi molecolare ha evidenziato numerosi ma brevi tratti di omologia tra le sequenze delle proteine del miocardio e alcuni antigeni dello streptococco. Tuttavia, il significato delle sporadiche omologie presenti tra antigeni microbici e proteine self nelle comuni malattie autoimmuni resta ancora da stabilire.

Alcune infezioni possono proteggere dallo sviluppo dell'autoimmunità. Studi epidemiologici suggeriscono che la riduzione degli episodi infettivi è

associata all'aumento dell'incidenza di diabete di tipo 1 e sclerosi multipla, e studi sperimentali mostrano che la malattia dei topi NOD compare molto più tardivamente se i topi contraggono infezioni. Sembra paradossale che le infezioni possano scatenare l'autoimmunità e nello stesso tempo inibire le malattie autoimmuni. I meccanismi alla base di queste osservazioni non sono noti.

Il microbioma intestinale e cutaneo può influenzare lo sviluppo delle malattie autoimmuni. Come abbiamo spiegato nel Capitolo 14, c'è grande interesse per l'idea che gli esseri umani siano colonizzati da microbi commensali che condizionano la maturazione e l'attivazione del sistema immunitario. Non sorprende che in modelli sperimentali, alterazioni nel microbioma si riflettano sull'incidenza e la gravità delle malattie autoimmuni. Il modo per sfruttare questa idea nel trattamento di patologie autoimmuni è argomento di grande interesse.

Altri fattori che regolano le risposte autoimmuni

Oltre che con alterazioni genetiche e con infezioni, lo sviluppo di malattie autoimmuni correla con numerosi altri fattori.

- ***Le alterazioni anatomiche nei tessuti, causate da infiammazione (di possibile origine infettiva), danno ischemico o traumi possono portare all'espressione di antigeni self normalmente inaccessibili al sistema immunitario***. Alla luce della loro segregazione anatomica è probabile che tali antigeni non abbiano causato tolleranza, quindi nel momento in cui vengono rilasciati possono essere riconosciuti da linfociti maturi e dare luogo a una risposta specifica. Esempi di antigeni anatomicamente segregati comprendono le proteine dell'occhio e dello sperma; si ritiene infatti che l'uveite post-traumatica o l'orchite possano essere dovute a risposte autoimmuni verso antigeni self rilasciati dalle loro sedi naturali in conseguenza del trauma.
- ***L'azione ormonale riveste un ruolo importante in alcune malattie autoimmuni***. Molte malattie autoimmuni hanno un'incidenza più elevata nelle donne rispetto agli uomini. Per esempio, il LES colpisce le donne con una frequenza circa 10 volte maggiore degli uomini. Una sindrome murina simile al LES (incrocio F_1 NZB × NZW) si sviluppa

solo nelle femmine e la sua insorgenza è ritardata dalla somministrazione di androgeni. Non è tuttavia noto se questa predominanza femminile sia solo dovuta all'influenza degli ormoni sessuali o anche ad altri fattori legati al sesso.

Le malattie autoimmuni rappresentano uno dei problemi scientifici e clinici più dibattuti in immunologia. Le attuali informazioni sui meccanismi patogenetici di queste malattie sono ancora incomplete e le teorie e le ipotesi continuano a prevalere sulle conoscenze. Ci si augura che l'introduzione di nuove tecnologie e la sempre migliore comprensione dei meccanismi che regolano la tolleranza permettano di ottenere risposte chiare e definitive agli enigmi che ancora circondano l'autoimmunità.

RIEPILOGO

* La tolleranza immunologica è lo stato di non responsività a un antigene che si instaura in seguito all'esposizione dei linfociti allo stesso antigene. La tolleranza verso gli antigeni autologhi è una proprietà fondamentale del sistema immunitario e la sua assenza si traduce nella comparsa di malattie autoimmuni. Gli antigeni possono essere somministrati in modo da indurre tolleranza piuttosto che immunità; questo fenomeno potrebbe essere sfruttato per la prevenzione e il trattamento del rigetto dei trapianti e di malattie autoimmuni e allergiche.
* La tolleranza centrale ha luogo negli organi linfoidi primari (timo e midollo osseo) quando i linfociti immaturi incontrano gli antigeni self. La tolleranza periferica si instaura quando i linfociti maturi riconoscono in particolari condizioni gli antigeni self nei tessuti periferici.
* Nei linfociti T, la tolleranza centrale agisce quando i timociti immaturi legano ad alta affinità un antigene self presente nel microambiente timico. Alcune di queste cellule muoiono (selezione negativa), altre si differenziano invece in linfociti T regolatori $FoxP3^+$ che hanno la funzione di inibire le risposte autoimmuni nei tessuti periferici.
* La tolleranza periferica è indotta nei linfociti T maturi attraverso diversi meccanismi. Nei linfociti T $CD4^+$ l'anergia si instaura in seguito all'incontro con l'antigene in assenza di un'adeguata costimolazione o dell'attivazione di recettori inibitori come CTLA-4 e PD-1. I linfociti T regolatori inibiscono la risposta immunitaria per mezzo di molteplici meccanismi. I linfociti T che incontrano gli antigeni self in assenza di altri stimoli o dopo ripetute stimolazioni muoiono per apoptosi.
* Nel caso dei linfociti B, la tolleranza centrale si genera quando le cellule B immature riconoscono gli antigeni self multivalenti all'interno del midollo osseo. A questo segue l'acquisizione di una nuova specificità, attraverso l'editing recettoriale o la morte per apoptosi. I linfociti B maturi che riconoscono gli antigeni self in assenza di cooperazione da parte dei linfociti T helper diventano anergici e muoiono per apoptosi o diventano funzionalmente non responsivi a causa dell'attivazione dei recettori inibitori.
* L'autoimmunità deriva dalla rottura della tolleranza al self. Nei soggetti geneticamente predisposti, le reazioni autoimmuni possono venire innescate da molteplici stimoli

ambientali, come le infezioni.

* La maggior parte delle malattie autoimmuni ha un'origine poligenica e numerosi geni di suscettibilità contribuiscono al loro sviluppo. I geni maggiormente coinvolti sono quelli che codificano per l'MHC; anche altri tipi di geni sono in grado di influenzare il processo di selezione e di regolazione dei linfociti autoreattivi.
* Le infezioni possono favorire il processo di autoimmunità attraverso numerosi meccanismi, come l'aberrante espressione di molecole costimolatorie e la cross-reattività tra antigeni microbici e antigeni self. Alcune infezioni possono proteggere gli individui dall'autoimmunità, mediante meccanismi ancora sconosciuti.

LETTURE CONSIGLIATE

Tolleranza immunologica, meccanismi generali

Baxter A.G.; Hodgkin P.D: Activation rules: the two-signal theories of immune activation. *Nature Reviews Immunology* 2:439–446 (2002).

Goodnow C.C.; Sprent J.; Fazekas de St Groth B.; Vinuesa C.G: Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 435:590–597 (2005).

Mueller D.L: Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nature Immunology* 11:21–27 (2010).

Parish I.A.; Heath W.R: Too dangerous to ignore: self-tolerance and the control of ignorant autoreactive T cells. *Immunology Cell Biology* 86:146–152 (2008).

Probst H.C.; Muth S.; Schild H: Regulation of tolerogenic function of steady-state DCs. *European Journal of Immunology* 44:927–933 (2014).

Redmond W.L.; Sherman L.A: Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes. *Immunity* 22:275–284 (2005).

Schwartz R.H: Historical overview of immunological tolerance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4:A006908 (2012).

Shlomchik M.J: Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation. *Immunity* 28:18–28 (2008).

Steinman R.M.; Hawiger D.; Nussenzweig M.C: Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 21:685–711 (2003).

Von Boehmer H.; Melchers F: Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nature Immunology* 11:14–20 (2010).

Tolleranza centrale

Hogquist K.A.; Baldwin T.A.; Jameson S.C: Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nature Reviews Immunology* 5:772–782 (2005).

Kyewski B.; Klein L: A central role for central tolerance. *Annual Review of Immunology* 24:571–606 (2006).

Laan M.; Peterson P: The many faces of Aire in central tolerance. *Frontiers in Immunology* 4:1–6 (2013).

Mathis D.; Benoist C: Aire. *Annual Review of Immunology* 27:287–312 (2009).

Nemazee D: Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nature Reviews Immunology* 6:728–740 (2006).

Anergia; recettori inibitori

Mueller D.L: E3 ubiquitin ligases as T cell anergy factors. *Nature Immunology* 5:883–890 (2004).

Okazaki T.; Chikuma S.; Iwai Y.; Fagarasan S.; Honjo T: A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical applications. *Nature Immunology* 14:1212–1218 (2013).

Walker L.S.; Sansom D.M: The emerging role of CTLA-4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nature Reviews Immunology* 11:852–863 (2011).

Wells A.D: New insights into the molecular basis of T cell anergy: anergy factors, avoidance sensors, and epigenetic imprinting. *Journal of Immunology* 182:7331–7341 (2009).

Apoptosi

Bidere N.; Su H.C.; Lenardo M.J: Genetic disorders of programmed cell death in the immune system. *Annual Review of Immunology* 24:321–352 (2006).

Griffith T.S.; Ferguson T.A: Cell death in the maintenance and abrogation of tolerance: the five Ws of dying cells. *Immunity* 35:456–466 (2011).

Strasser A.; Jost P.J.; Nagata S: The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 30:321–326 (2009).

Strasser A.; Puthalakath H.; O'Reilly L.A.; Bouillet P: What do we know about the mechanisms of elimination of autoreactive T and B cells and what challenges remain. *Immunology and Cell Biology* 86:57–66 (2008).

Cellule T regolatorie

Bilate A.M.; Lafaille J.J: Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annual Review of Immunology* 30:733–758 (2012).

Burzyn D.; Benoist C.; Mathis D: Regulatory T cells in nonlymphoid tissues. *Nature Immunology* 14 1007–1013 (2013).

Campbell D.J.; Koch M.A: Phenotypic and functional specialization of $FoxP3^+$ regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology* 11:119–130 (2011).

Curotto M.A.; Lafaille J.L: Natural and adaptive $Foxp3^+$ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30:626–635 (2009).

Hsieh C.-S.; Lee M.-H.; Lio C.-W.J: Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nature Reviews Immunology* 12:157–167 (2012).

Josefowicz S.Z.; Lu L.-F.; Rudensky Y: Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annual Review of Immunology* 30:531–564 (2012).

Li M.O.; Flavell R.A: TGF-β: a master of all T cell trades. *Cell* 134:392–404 (2008).

Liston A.; Gray D.H.D: Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nature Reviews Immunology* 14:154–165 (2014).

Liston A.; Piccirillo C.A: Developmental plasticity of murine and human Foxp3+ regulatory T cells. *Advances in Immunology* 119:85–106 (2013).

Ohkura N.; Kitagawa Y.; Sakaguchi S: Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity* 38:414–423 (2013).

Riley J.L.; June C.H.; Blazar B.R: Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning. *Immunity* 30:656–665 (2009).

Sakaguchi S.; Miyara M.; Costantino C.M.; Hafler D.A: $FOXP3^+$ regulatory T cells in the human immune system. Nature Reviews Immunology 10:490–500 (2010).

Sakaguchi S.; Yamaguchi T.; Nomura T.; Ono M: Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133:775–787 (2008).

Tang Q.; Bluestone J.A: The Foxp3^{+} regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nature Immunology* 9:239–244 (2008).

Wing K.; Sakaguchi S: Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nature Immunology* 11:7–13 (2010).

Ziegler S.F: FoxP3: of mice and men. *Annual Review of Immunology* 6:209–226 (2006).

Meccanismi dell'autoimmunità: genetica

Cheng M.H.; Anderson M.S: Monogenic autoimmunity. Annual *Review of Immunology* 30:393–427 (2012).

Deitiker P.; Atassi M.Z: Non-MHC genes linked to autoimmune disease. *Crticial Reviews of Immunology* 32:193–285 (2012).

Fernando M.M.; Stevens C.R.; Walsh E.C.; De Jager P.L.; Goyette P.; Plenge R.M.; Vyse T.J.; Rioux J.D: Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. *PLoS Genetics* 4 (2008). e1000024.

Gregersen P.K.; Olsson L.M: Recent advances in the genetics of autoimmune disease. *Annual Review of Immunology* 27:363–391 (2009).

Pascual V.; Chaussubel D.; Banchereau J: A genomic approach to human autoimmune diseases. *Annual Review of Immunology* 28:535–571 (2010).

Voight B.F.; Cotsapas C: Human genetics offers an emerging picture of common pathways and mechanisms in autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* 24:552–557 (2012).

Zenewicz L.; Abraham C.; Flavell R.A.; Cho J: *Unraveling the genetics of autoimmunity*. Cell 140:791–797 (2010).

Meccanismi dell'autoimmunità: fattori ambientali

Belkaid Y.; Hand T.W: *Role of the microbiota in immunity and inflammation*. Cell 157:121–141 (2014).

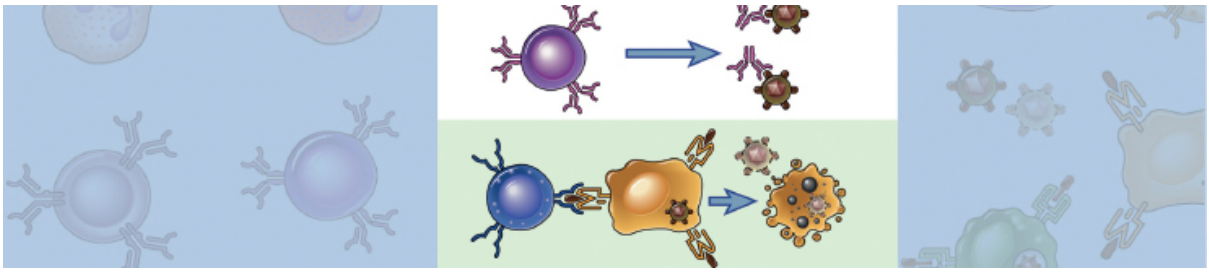
Chervonsky A: Influence of microbial environment on autoimmunity. *Nature Immunology* 11:28–35 (2010).

Fourneau J.M.; Bach J.M.; van Endert P.M.; Bach J.F: The elusive case for a role of mimicry in autoimmune diseases. *Molecular Immunology* 40:1095–1102 (2004).

Mathis D.; Benoist C: Microbiota and autoimmune disease: the hosted self. *Cell Host Microbes* 10:297–301 (2011).

CAPITOLO

16



Immunità ai microrganismi

CARATTERISTICHE GENERALI DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA AI MICRORGANISMI

IMMUNITÀ AI BATTERI EXTRACELLULARI

- Immunità innata ai batteri extracellulari
- Immunità specifica ai batteri extracellulari
- Effetti patologici delle risposte immunitarie ai batteri extracellulari
- Elusione delle risposte immunitarie da parte dei batteri extracellulari

IMMUNITÀ AI BATTERI INTRACELLULARI

- Immunità innata ai batteri intracellulari
- Immunità specifica ai batteri intracellulari
- Elusione delle risposte immunitarie da parte dei batteri intracellulari

IMMUNITÀ AI MICETI

- Immunità innata e specifica ai miceti

IMMUNITÀ AI VIRUS

- Immunità innata ai virus
- Immunità specifica ai virus
- Elusione delle risposte immunitarie da parte dei virus

IMMUNITÀ AI PARASSITI

- Immunità innata ai parassiti
- Immunità specifica ai parassiti
- Elusione delle risposte immunitarie da parte dei parassiti

STRATEGIE PER LO SVILUPPO DEI VACCINI

- Vaccini batterici e virali attenuati e inattivati
- Vaccini con antigeni purificati (a subunità antigeniche)
- Vaccini con antigeni sintetici
- Vaccini virali vivi in forma ricombinante
- Vaccini a DNA
- Adiuvanti e immunomodulatori
- Immunizzazione passiva

RIEPILOGO

Nei precedenti capitoli abbiamo descritto le diverse componenti del sistema immunitario e le modalità con le quali le risposte immunitarie vengono attuate. In genere, abbiamo fatto riferimento alla protezione contro le infezioni, considerandola la principale funzione fisiologica del sistema immunitario, e

abbiamo esaminato le risposte immunitarie nel contesto delle risposte contro i microrganismi. In questo capitolo integreremo tali conoscenze analizzando le principali caratteristiche delle risposte nei confronti dei diversi tipi di microrganismi patogeni e i meccanismi da questi utilizzati per cercare di sfuggire alle difese immunitarie dell'ospite.

La progressione di una malattia infettiva in un individuo si sviluppa attraverso una serie di complesse interazioni tra microrganismo e ospite; gli eventi chiave nel corso di un'infezione consistono nell'ingresso del microrganismo, nell'invasione e colonizzazione dei tessuti dell'ospite, nell'elusione delle difese immunitarie e, infine, nel danno tissutale e/o nelle alterazioni funzionali dell'organismo ospite. Alcuni microrganismi causano direttamente la malattia uccidendo le cellule dell'ospite o rilasciando tossine, che possono provocare danno tissutale e alterazioni funzionali locali o a distanza, in cellule e tessuti che non sono infettati. I microrganismi, inoltre, possono causare malattie che dipendono dalla stimolazione di risposte immunitarie che danneggiano sia i tessuti infetti sia quelli normali. Sono molte le caratteristiche dei microrganismi che ne determinano la virulenza, così come sono molteplici i meccanismi che contribuiscono alla patogenesi della malattia infettiva. La trattazione della patogenesi delle infezioni microbiche esula dallo scopo di questo volume e non verrà quindi qui presa in considerazione. Focalizzeremo invece la nostra attenzione sulle risposte immunitarie dell'ospite agli agenti patogeni.

CARATTERISTICHE GENERALI DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA AI MICRORGANISMI

Nonostante le risposte difensive dell'ospite nei confronti dei microrganismi siano varie e numerose, è possibile definire alcune importanti caratteristiche generali.

- ***La difesa contro i microrganismi è mediata dai meccanismi effettori dell'immunità innata e specifica***. L'immunità innata costituisce una prima linea di difesa, mentre l'immunità specifica fornisce una risposta più mirata e prolungata nel tempo. Molti agenti patogeni si sono evoluti

per resistere ai meccanismi dell'immunità innata; per questa ragione, la protezione contro tali infezioni dipende essenzialmente dall'immunità specifica. Nelle risposte adattative vengono prodotte numerose cellule effettrici e molti anticorpi, il cui ruolo è eliminare gli agenti patogeni, e linfociti della memoria, che meglio proteggono l'individuo nei confronti di successive infezioni da parte dello stesso microrganismo.

- ***Il sistema immunitario risponde in modo diversificato e specializzato ai diversi patogeni al fine di combatterli nel modo più efficace possibile***. Microrganismi diversi devono essere fronteggiati tramite l'attivazione di meccanismi effettori differenti e il sistema immunitario adattativo si è evoluto per poter rispondere in modo ottimale ai diversi microrganismi. La generazione di diverse sottopopolazioni di linfociti T $CD4^+$, T_H1, T_H2 e T_H17, e la produzione di differenti classi isotipiche di anticorpi rappresentano eccellenti esempi della specializzazione dell'immunità specifica, che sono stati già descritti nei capitoli precedenti. In questo capitolo tratteremo anche la loro importanza in relazione ai meccanismi di difesa attivati contro diversi tipi di microrganismi.
- ***La patogenicità del microrganismo e la sua sopravvivenza nell'ospite sono fortemente condizionati dalla capacità dell'agente infettivo di eludere o resistere ai meccanismi effettori dell'immunità***. Gli agenti infettivi e il sistema immunitario si sono evoluti parallelamente e sono impegnati in una costante lotta per la sopravvivenza; l'esito delle infezioni dipende dall'equilibrio che si instaura tra la risposta immunitaria dell'ospite e la capacità del microrganismo di resistervi. Come vedremo più avanti, i microrganismi hanno sviluppato nel corso dell'evoluzione diverse strategie per sopravvivere alle potenti difese messe in atto dal sistema immunitario.
- ***In molti casi i microrganismi stabiliscono infezioni latenti o persistenti, che il sistema immunitario controlla senza però essere in grado di eliminare l'agente patogeno, che sopravvive in assenza di propagazione dell'infezione***. La latenza è una caratteristica comune alle infezioni causate da alcuni virus, soprattutto quelli a DNA appartenenti alle famiglie degli herpesvirus e dei poxvirus, e da alcuni batteri intracellulari. Nelle infezioni virali latenti, il DNA virale può essere integrato nel DNA della cellula infettata senza che il virus provochi alcuna infezione nell'ospite. Nel caso delle infezioni batteriche persistenti, come per

esempio la tubercolosi, il bacillo può sopravvivere all'interno delle vescicole endosomiali delle cellule infettate. In tutte queste situazioni, qualora il sistema immunitario dell'ospite risulti compromesso per qualche ragione (neoplasia o chemioterapia, terapia immunosoppressiva nel rigetto da trapianto, infezione da HIV), può verificarsi la riattivazione del imicrorganismo latente con una conseguente infezione che può causare importanti problemi clinici.

- ***In molte infezioni, il danno tissutale e la malattia possono essere causati dalla risposta dell'ospite piuttosto che dall'agente infettivo in sé***. L'immunità è necessaria per la sopravvivenza dell'ospite, ma rappresenta anche una potenziale causa di danno tissutale.
- ***I difetti ereditari e acquisiti dell'immunità innata e specifica sono cause importanti di suscettibilità alle infezioni.*** Molti disturbi acquisiti sono ben noti, come la sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS), causata dal virus dell'immunodeficienza umana (HIV). Piuttosto ben conosciuti sono anche i difetti ereditari dell'immunità specifica, che si configurano spesso come patologie di interesse pediatrico. Inoltre, difetti sfumati e poco definiti delle difese dell'ospite possono essere alla base di molte infezioni comuni. Descriveremo dettagliatamente le immunodeficienze nel Capitolo 21.

In questo capitolo prenderemo in considerazione le principali caratteristiche delle risposte immunitarie contro cinque diversi tipi di agenti patogeni: batteri intracellulari, batteri extracellulari, virus, miceti, protozoi e parassiti multicellulari, così da poter definire al meglio le principali caratteristiche dell'immunità ai microrganismi (Tab. 16-1; vedi anche la Tab. 16-4). Lo studio della risposta immunitaria verso tali microrganismi illustrerà efficacemente i vari aspetti delle risposte ai patogeni e il significato fisiologico delle funzioni effettrici dei linfociti già trattati nei capitoli precedenti.

IMMUNITÀ AI BATTERI EXTRACELLULARI

I batteri extracellulari sono capaci di replicarsi al di fuori delle cellule dell'ospite, come, per esempio, può avvenire nel sangue, nei tessuti connettivi e a livello delle vie aeree e del lume intestinale. Molte specie diverse di batteri extracellulari sono patogene e le malattie a esse associate possono essere

causate attraverso due principali meccanismi. In primo luogo, questi batteri inducono un processo infiammatorio che causa danno tissutale nella sede di infezione: è questo il motivo per cui i batteri piogeni (in grado di formare pus) scatenano le infezioni suppurative nell'uomo. In secondo luogo, molti di questi batteri producono tossine in grado di esercitare diversi effetti patologici. Le tossine possono essere endotossine (componenti della parete della cellula batterica) o esotossine (attivamente secrete dai batteri). L'endotossina dei batteri Gram-negativi, detta anche lipopolisaccaride (LPS), è stata descritta nel Capitolo 4 come un potente attivatore dei macrofagi, delle cellule dendritiche e delle cellule endoteliali. Molte esotossine sono citotossiche, altre causano malattie attraverso diversi meccanismi. Per esempio, la tossina della difterite blocca la sintesi proteica nelle cellule infettate, la tossina del colera interferisce con il trasporto di ioni e acqua, la tossina del tetano inibisce la trasmissione neuromuscolare e la tossina dell'antrace interferisce con diverse fondamentali vie biochimiche di trasmissione del segnale nelle cellule infettate. Alcune esotossine interferiscono con le normali funzioni cellulari senza portare a morte le cellule, altre ancora stimolano la produzione di citochine che sono, in ultima analisi, responsabili dei sintomi della malattia.

TABELLA 16-1 Esempi di microrganismi patogeni

Microbo	Esempi di malattie nell'uomo	Meccanismi di patogenicità
Batteri extracellulari		
Staphylococcus aureus	Infezioni della cute e dei tessuti molli, ascessi polmonari Sistemiche: sindrome da shock tossico, avvelenamento da cibo	Infezioni della cute; infiammazioni acute indotte da tossine; morte cellulare causata da tossine in grado di formare pori Infezioni sistemiche: produzione di citochine da parte dei linfociti T indotta dall'enterotossina ("superantigene"), con conseguenti necrosi della cute, shock, diarrea
Streptococcus pyogenes (gruppo A)	Faringite Infezioni cutanee: impetigine, erisipela; cellulite Sistemiche: scarlattina	Infiammazione acuta indotta da tossine varie (come la streptolisina O che danneggia le membrane cellulari)
Streptococcus pyogenes (pneumococco)	Polmonite, meningite	Infiammazione acuta indotta dai costituenti della parete cellulare; la pneumolisina è simile alla streptolisina O
Escherichia coli	Infezioni del tratto urinario,	Tossine che agiscono sull'epitelio

	gastroenterite, shock settico	intestinale e causano un aumento della secrezione di cloruri e acqua; l'endotossina (LPS) stimola la secrezione di citochine da parte dei macrofagi
Vibrio cholerae	Diarrea (colera)	La tossina colerica ADP ribosila una subunità delle proteine G e porta a un incremento dell'AMP-ciclico nelle cellule dell'epitelio intestinale che determina la secrezione di cloruri e la perdita di acqua
Clostridium tetani	Tetano	La tossina tetanica si lega alla placca motrice neuromuscolare e causa una contrazione muscolare irreversibile
Neisseria meningitidis (meningococco)	Meningite	Infiammazione acuta e malattia sistemica causata da potenti endotossine
Corynebacterium diphtheriae	Difterite	La tossina difterica ADP ribosila il fattore di allungamento-2 e inibisce la sintesi proteica
Batteri intracellulari		
Micobatteri	Tubercolosi, lebbra	Attivazione dei macrofagi che determina l'infiammazione granulomatosa e la distruzione tissutale
Listeria monocytogenes	Listeriosi	La listeriolisina danneggia le membrane cellulari
Legionella pneumophila	Morbo del legionario	La citotossina lisa le cellule e causa danno e infiammazione polmonare
Miceti		
Candida albicans	Candidiasi	Infiammazione acuta; lega le proteine del complemento
Aspergillus fumigatus	Aspergillosi	Invasione e trombosi dei vasi sanguigni che causano necrosi ischemica e danno celllulare
Histoplasma capsulatum	Istoplasmosi	Infezione polmonare causata da un'infiammazione granulomatosa
Virus		
Polio	Poliomelite	Inibisce la sintesi proteica nella cellula ospite (tropismo per i motoneuroni nel corno anteriore del midollo spinale)

Influenza	Polmonite influenzale	Inibisce la sintesi proteica nella cellula ospite (tropismo per l'epitelio ciliato)
Rabbia	Encefalite rabica	Inibisce la sintesi proteica nella cellula ospite (tropismo per i nervi periferici)
Herpes simplex	Varie infezioni erpetiche (cute, sistemiche)	Inibisce la sintesi proteica nella cellula ospite; danno funzionale delle cellule immunitarie
Epatite B	Epatite virale	Risposta dei CTL dell'ospite contro gli epatociti infettati
Virus di Epstein-Barr (EBV)	Mononucleosi infettiva; proliferazione dei linfociti B, linfoma	Infezione acuta: lisi cellulare (tropismo per i linfociti B) Infezione latente: stimolazione della proliferazione dei linfociti B
Virus dell'immunodeficienza umana (HIV)	Sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS)	Molteplici: uccisione dei linfociti $CD4^+$; danno funzionale delle cellule immunitarie (vedi Cap. 20)

La tabella riporta alcuni esempi di classi differenti di microrganismi patogeni, con un breve riassunto dei meccanismi, noti o presunti, di danno cellulare e malattia. Esempi di parassiti sono riportati nella Tabella 16-4.
ADP (*Adenosine Diphosphate*), adenosina difosfato; AMP (*Adenosine Monophosphate*), adenosina monofosfato; CTL (*Cytotoxic T Lynphocyte*), linfocita T citotossico; LPS, lipopolisaccaride.
(*Questa tabella è stata compilata con l'aiuto della Dr.ssa Arlene Sharpe' Department of Pathology, Harvard Medical School and Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts.*)

Immunità innata ai batteri extracellulari

L'attivazione del complemento, la fagocitosi e la risposta infiammatoria sono i principali meccanismi dell'immunità innata ai batteri extracellulari.

- ***Attivazione del complemento***. I peptidoglicani della parete cellulare dei batteri Gram-positivi e il LPS dei batteri Gram-negativi attivano il complemento attraverso la via alternativa (vedi Cap. 13). I batteri che esprimono sulla loro superficie residui di mannosio possono invece legarsi a una lectina omologa alla subunità C1q, inducendo così l'attivazione del complemento attraverso la via lectinica. Le conseguenze dell'attivazione del complemento sono l'opsonizzazione e il potenziamento della fagocitosi dei batteri. Inoltre, il complesso di attacco alla membrana, generato dall'attivazione del complemento, induce la lisi dei batteri, in particolare di quelli appartenenti al genere *Neisseria* che

sono particolarmente suscettibili alla lisi a causa della loro sottile parete cellulare. Infine, i prodotti di attivazione del complemento contribuiscono alla risposta infiammatoria attraverso il reclutamento e l'attivazione dei leucociti.

- ***Attivazione dei fagociti e infiammazione***. I fagociti (neutrofili e macrofagi) riconoscono i batteri extracellulari attraverso recettori di superficie, come i recettori per il mannosio e i recettori scavenger, mentre utilizzano recettori per il frammento Fc degli anticorpi e recettori per il complemento per legare batteri opsonizzati con anticorpi o proteine del complemento, rispettivamente. I prodotti microbici attivano i recettori Toll-like (*Toll-Like Receptors*, TLR) e vari sensori citoplasmatici nei fagociti e in altre cellule. Alcuni di questi recettori sono coinvolti nella fagocitosi dei microrganismi (per esempio i recettori per il mannosio, i recettori scavenger ecc.); altri stimolano l'attività microbicida dei fagociti (specialmente i TLR); altri ancora promuovono sia la fagocitosi sia l'attivazione dei fagociti (i recettori per Fc e per il complemento) (vedi Cap. 4). Inoltre, le cellule dendritiche e i fagociti, attivati dai microrganismi, secernono le citochine che sono responsabili dell'infiltrazione leucocitaria che solitamente si osserva a livello dei focolai infettivi (un classico segno di risposta infiammatoria). I leucociti reclutati in quella sede fagocitano ed eliminano i batteri.

Immunità specifica ai batteri extracellulari

La risposta anticorpale, che costituisce la principale risposta protettiva diretta contro i batteri extracellulari, ha la funzione di prevenire l'infezione, di eliminare i microrganismi e di neutralizzare le loro tossine (Fig. 16-1, *A*). La risposta anticorpale contro i batteri extracellulari è diretta contro gli antigeni espressi sulla parete cellulare e le tossine secrete o di superficie, costituite da polisaccaridi o proteine. I polisaccaridi rappresentano il prototipo degli antigeni timo-indipendenti e l'immunità umorale rappresenta il principale meccanismo di difesa contro i batteri provvisti di capsula polisaccaridica. I meccanismi effettori usati dagli anticorpi per combattere queste infezioni sono la neutralizzazione, l'opsonizzazione e la fagocitosi, nonché l'attivazione del complemento attraverso la via classica (vedi Cap. 13). La neutralizzazione è mediata dagli anticorpi di classe IgG (immunoglobulina G) ad alta affinità, da IgM e da IgA; queste ultime agiscono prevalentemente

nel lume delle mucose; l'opsonizzazione è mediata da alcune sottoclassi di IgG, mentre l'attivazione del complemento è secondaria all'intervento delle IgM e di alcune sottoclassi di IgG.

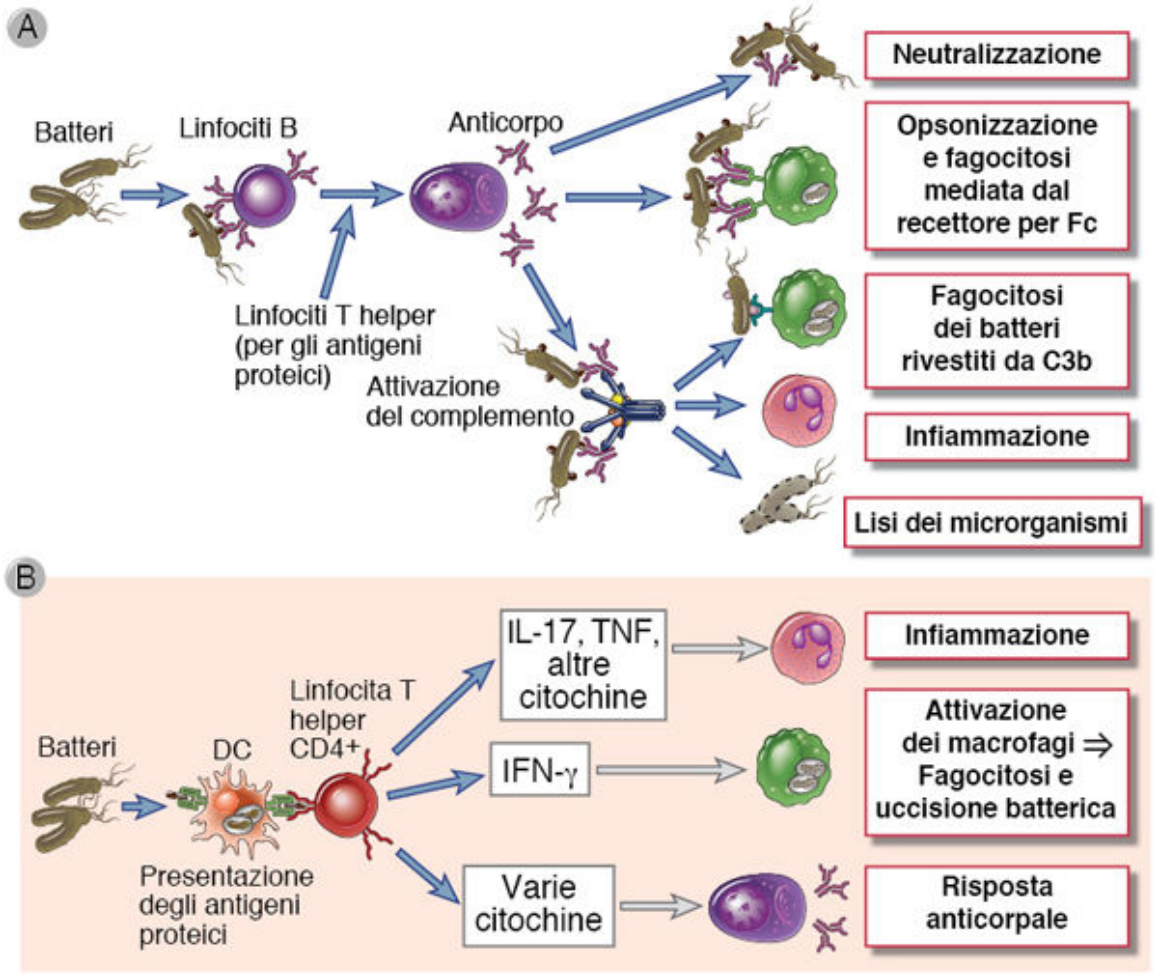


FIGURA 16-1 Risposta immunitaria adattativa ai batteri extracellulari. La risposta immunitaria specifica ai batteri extracellulari e alle loro tossine consiste nella produzione di anticorpi (**A**) e nell'attivazione dei linfociti T helper $CD4^+$ (**B**). Gli anticorpi neutralizzano ed eliminano i microrganismi e le tossine attraverso numerosi meccanismi. I linfociti T helper producono citochine che stimolano l'infiammazione, la risposta dei linfociti B. DC (*Dentric Cells*), cellule dendritiche.

Gli antigeni proteici dei batteri extracellulari attivano anche i linfociti T helper $CD4^+$, che producono citochine in grado di provocare l'infiammazione a livello locale, di potenziare l'attività fagocitica e microbicida dei macrofagi e dei neutrofili e di stimolare la produzione di anticorpi (Fig. 16-1, *B*). Le risposte T_H17 indotte da questi microrganismi possono reclutare neutrofili e monociti e promuovere un processo

infiammatorio nei siti di infezione. I soggetti che hanno difetti genetici dello sviluppo dei linfociti T_H17 e quelli nei quali si osservano anticorpi neutralizzanti specifici per l'interleuchina-17 (IL-17) hanno una maggiore suscettibilità a sviluppare infezioni batteriche e micotiche, che si manifesta con la formazione di ascessi cutanei multipli. I batteri extracellulari inducono anche risposte T_H1, e l'interferone γ (IFN-γ), prodotto dalle cellule T_H1, è responsabile dell'attivazione dei macrofagi, che eliminano i microrganismi fagocitati. Questa citochina può anche stimolare la produzione di isotipi anticorpali opsonizzanti e in grado di legare il complemento.

Effetti patologici delle risposte immunitarie ai batteri extracellulari

Le principali possibili conseguenze patologiche della risposta ai batteri extracellulari sono l'infiammazione e lo shock settico, causati principalmente dalle citochine prodotte dai macrofagi attivati. Dunque, le stesse reazioni dei neutrofili e dei macrofagi che sono necessarie all'eradicazione dell'infezione possono anche causare un danno tissutale attraverso il rilascio, a livello locale, di specie reattive tossiche dell'ossigeno e di enzimi lisosomiali, anche se nella maggior parte dei casi tali fenomeni sono autolimitanti e ben controllati. Le citochine secrete dai leucociti in risposta ai derivati batterici stimolano la produzione di proteine di fase acuta e sono responsabili delle manifestazioni sistemiche dell'infezione (vedi Cap. 4). Lo **shock settico** è una grave conseguenza patologica di infezioni disseminate causate da alcuni batteri Gram-negativi e Gram-positivi. Le principali manifestazioni cliniche dello shock settico sono il collasso cardiocircolatorio e la coagulazione intravascolare disseminata. Le fasi precoci di questo shock sono causate dalle citochine prodotte dai macrofagi attivati da componenti della parete cellulare batterica, primi tra i quali LPS e peptidoglicani. Il fattore di necrosi tumorale (*Tumor Necrosis Factor*, TNF), l'interleuchina (IL)-6 e l'IL-1 sono i principali mediatori citochinici dello shock settico, ma anche altre citochine, come l'IFN-γ e l'IL-12, possono contribuire in modo significativo a questa patologia (vedi Cap. 4). La veloce e massiccia produzione di una grande quantità di citochine viene talvolta definita tempesta citochinica. Osservazioni sperimentali indicano come lo shock settico si associ a difetti del sistema immunitario verosimilmente riconducibili a deficit o delezione dei linfociti T, che potrebbero tradursi in un mancato controllo della disseminazione batterica.

Alcune tossine batteriche sono in grado di stimolare tutti quei linfociti T che esprimono una particolare regione V_β del recettore delle cellule T (*T Cell Receptor*, TCR). Tali tossine sono chiamate **superantigeni**, poiché esse, come gli antigeni, si legano al TCR e alle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) di classe II (sebbene non nella tasca della molecola), ma hanno la capacità di attivare un numero di linfociti T molto maggiore rispetto a quelli stimolati da antigeni peptidici convenzionali (Fig. 16-2). La loro importanza è legata alla capacità di attivare un numero elevato di linfociti T, con la conseguente produzione di grandi quantità di citochine che a loro volta possono determinare una sindrome infiammatoria sistemica.

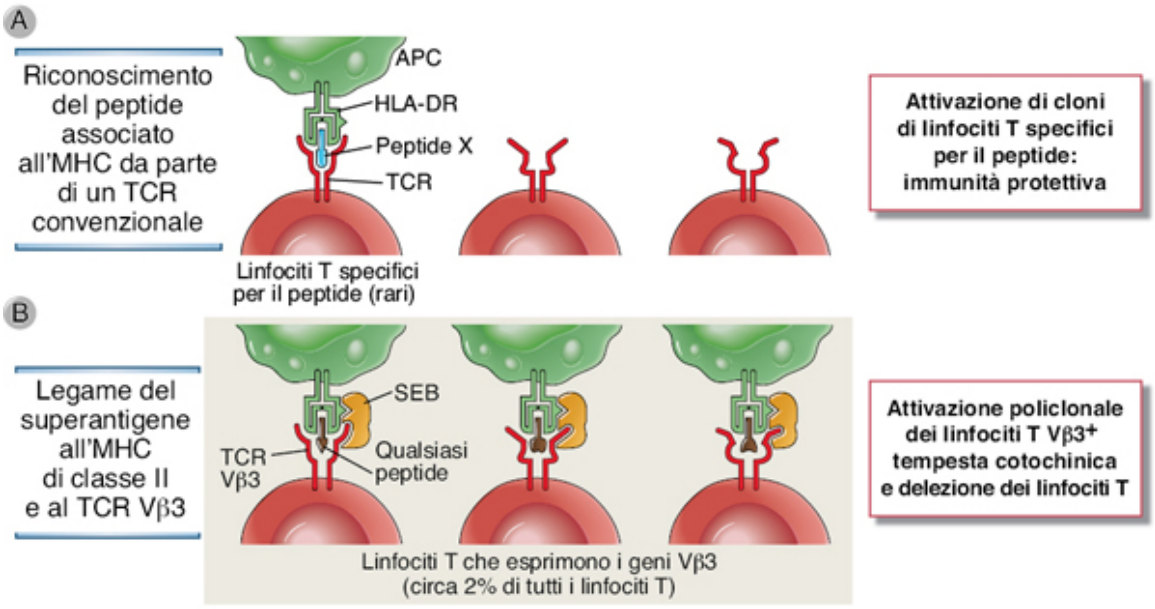


FIGURA 16-2 Attivazione policlonale dei linfociti T da parte dei superantigeni batterici. A. Gli antigeni convenzionali, formati da un peptide associato al sito di legame per il peptide di una molecola MHC, vengono riconosciuti da cloni di linfociti T che si attivano e generano linfociti T effettori responsabili della protezione **B.** Al contrario, un superantigene lega molecole MHC di classe II al di fuori del sito di legame per il peptide e simultaneamente si lega alla regione variabile di diversi tipi di catene β del TCR, indipendentemente dalla specificità del TCR per il peptide. Diversi superantigeni si legano a TCR che contengono diverse famiglie Vβ. Poiché molti linfociti T condividono l'espressione di catene β del TCR di una particolare famiglia Vβ, i superantigeni possono attivare un ampio spettro di linfociti T. Nell'esempio illustrato, il superantigene enterotossina stafilococcica B (SEB) si lega a HLA-DR e alle regioni V dei TCR che appartengono alla famiglia Vβ3. *APC*, cellula che presenta l'antigene.

Una conseguenza tardiva della risposta immunitaria umorale all'infezione batterica può essere la produzione di anticorpi che hanno un'azione patologica per l'organismo. Gli esempi più evidenti di questo fenomeno sono due rare

complicazioni delle infezioni streptococciche dell'orofaringe e della cute che si possono manifestare settimane o addirittura mesi dopo che l'infezione è stata debellata. La febbre reumatica fa seguito all'infezione faringea da parte di alcuni tipi sierologici di streptococchi β-emolitici. L'infezione porta alla produzione di anticorpi diretti contro una proteina della parete cellulare batterica (la proteina M) che possono cross-reagire con proteine miocardiche, depositandosi nel cuore, dove causano una reazione infiammatoria (miocardite). La glomerulonefrite post-streptococcica è una conseguenza delle infezioni cutanee o faringee da altri sierotipi di streptococco β-emolitico. Gli anticorpi prodotti formano immunocomplessi con gli antigeni batterici e si depositano nel glomerulo renale causando la nefrite.

Elusione delle risposte immunitarie da parte dei batteri extracellulari

La virulenza dei batteri extracellulari è conseguenza di una serie di meccanismi che permettono ai microrganismi di resistere alla risposta immunitaria innata dell'ospite (Tab. 16-2). I batteri muniti di capsule polisaccaridiche sono resistenti alla fagocitosi e risultano quindi più virulenti dei ceppi omologhi non capsulati. Le capsule di molti batteri Gram-positivi e Gram-negativi contengono residui di acido sialico che inibiscono l'attivazione della via alternativa del complemento.

TABELLA 16-2 Meccanismi di elusione della risposta immunitaria da parte dei batteri

Meccanismo di elusione immunitaria	Esempi
Batteri extracellulari	
Modificazione degli antigeni	*Neisseria gonorrhoeae, Escherichia coli, Salmonella typhimurium*
Inibizione dell'attivazione del complemento	Numerosi batteri
Resistenza alla fagocitosi	*Pneumococcus, Neisseria meningitidis*
Neutralizzazione delle specie reattive dell'ossigeno	Stafilococchi catalasi-positivi
Batteri intracellulari	
Inibizione della formazione dei fagolisosomi	*Mycobacterium tuberculosis, Legionella pneumophila*
Neutralizzazione delle specie reattive dell'ossigeno	*Mycobacterium leprae* (glicolipide fenolico)
Rottura della membrana dei	*Listeria monocytogenes* (emolisina)

fagosomi, fuoriuscita nel citoplasma

Un meccanismo usato dai batteri per eludere l'immunità umorale è la continua mutazione dei loro antigeni di superficie (Fig. 16-3). Alcuni antigeni espressi sulla superficie di molti batteri, come i gonococchi e l'*Escherichia coli*, sono localizzati in estroflessioni (pili) della membrana responsabili dell'adesione alle cellule dell'ospite. Il principale antigene dei pili è una proteina detta pilina. Nei gonococchi, questi geni vanno incontro a fenomeni di conversione genica, che permettono alla progenie di produrre fino a un milione di molecole di pilina antigenicamente distinte. Questa proprietà consente ai batteri di sfuggire all'attacco da parte degli anticorpi antipilina, sebbene il principale significato di questo fenomeno sembri essere quello di selezionare i batteri con i pili più adesivi nei confronti della cellula ospite, in modo da aumentare la loro virulenza. I cambiamenti nella produzione di glicosidasi portano, invece, a modificazioni chimiche dell'LPS e di altri polisaccaridi, che permettono al microrganismo di eludere la risposta anticorpale diretta contro questi antigeni. I batteri possono infine modificare la produzione nel tempo degli antigeni di superficie o rilasciarli sotto forma di vescicole che si distaccano dalla membrana.

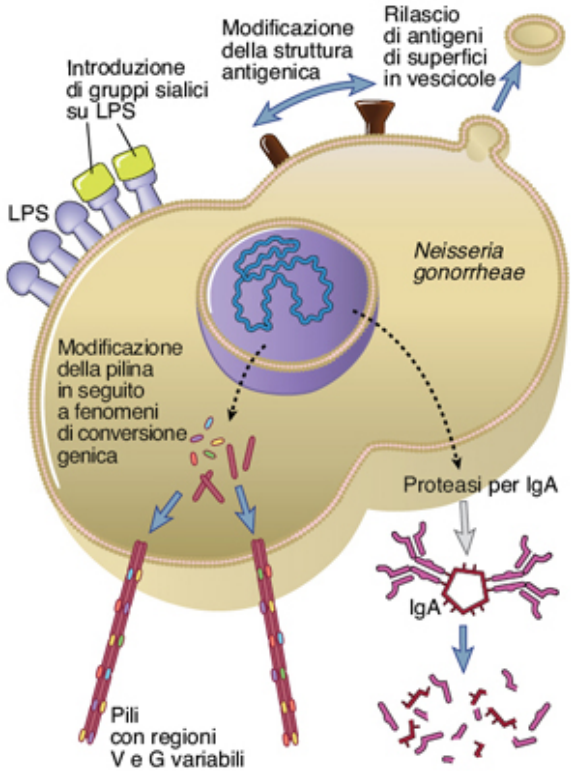


FIGURA 16-3 Meccanismi di elusione del sistema immunitario da parte dei batteri. Sono illustrati i molteplici meccanismi usati da una specie batterica, la *Neisseria*, per eludere l'immunità umorale.

IMMUNITÀ AI BATTERI INTRACELLULARI

Una caratteristica dei batteri intracellulari è la loro capacità di sopravvivere e persino di replicarsi all'interno dei fagociti. In tal modo questi microrganismi sono inaccessibili agli anticorpi circolanti, la loro eliminazione richiede dunque l'intervento dell'immunità cellulare (Fig. 16-4). Come vedremo in seguito, le conseguenze patologiche dell'infezione di molti batteri intracellulari sono dovute alla risposta dell'ospite verso questi microrganismi.

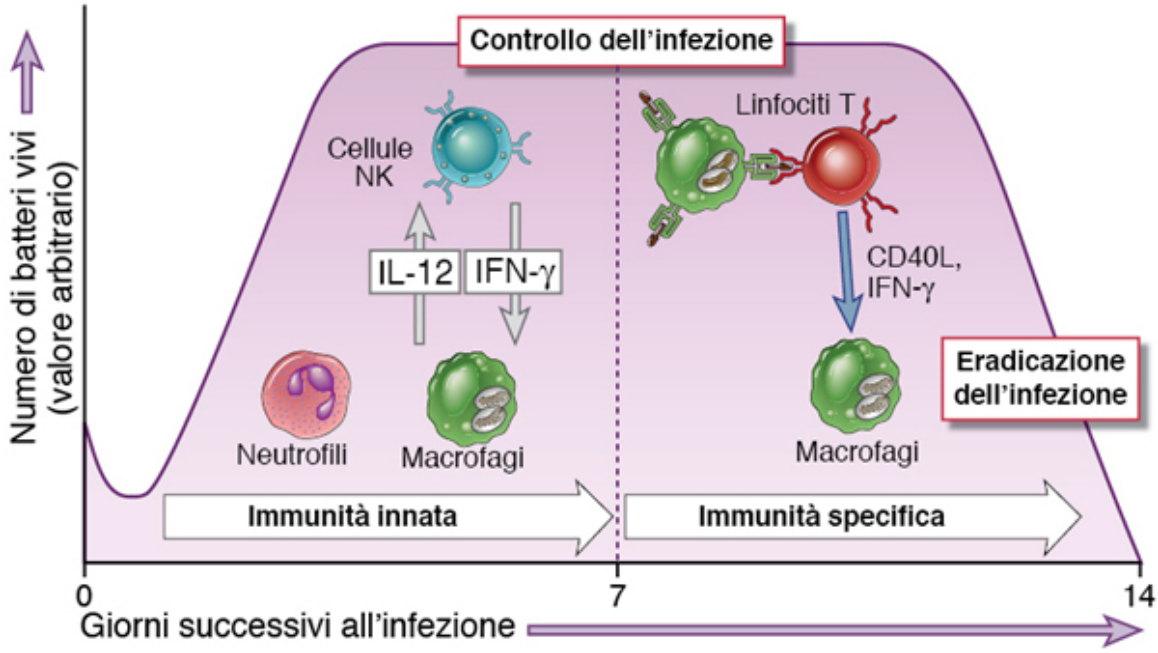


FIGURA 16-4 Risposte immunitarie innate e specifiche ai batteri intracellulari. La risposta immunitaria innata ai batteri intracellulari consiste nell'interazione tra i fagociti e le cellule NK che è mediata dalle citochine (IL-12 e IFN-γ). La tipica risposta immunitaria specifica verso questi microrganismi è costituita dall'immunità cellulo-mediata, in cui i linfociti T stimolano nei fagociti i meccanismi deputati all'eliminazione dei microrganismi. L'immunità innata può controllare la crescita dei batteri, ma per la loro eradicazione è necessario l'intervento dell'immunità specifica. Queste conclusioni si basano in gran parte sull'analisi dell'infezione da *Listeria monocytogenes* nel topo; il numero di batteri vivi riportato in ordinata rappresenta il numero di colonie batteriche che si possono ottenere dai tessuti dell'animale infettato.

Immunità innata ai batteri intracellulari

La risposta immunitaria innata ai batteri intracellulari si basa principalmente sull'azione dei fagociti e delle cellule NK (*Natural Killer*). I fagociti, inizialmente i neutrofili e più tardi i macrofagi, inglobano e tentano di uccidere i batteri intracellulari, i quali però sono resistenti alla degradazione all'interno dei fagociti. I prodotti di questi batteri sono riconosciuti dai TLR e da proteine citoplasmatiche della famiglia dei recettori di tipo NOD (*NOD-Like Receptors*, NLR), responsabili dell'attivazione dei fagociti (vedi Cap. 4). In particolare, il DNA batterico nel citosol stimola la produzione dell'interferone di tipo I attraverso una via di attivazione STING-mediata.

I batteri intracellulari attivano le cellule NK inducendo l'espressione di ligandi attivatori sulle cellule infettate e stimolando la produzione di IL-12 e di IL-15 da parte delle cellule dendritiche (*Dendritic Cells*, DC) e dei macrofagi; entrambe questa citochine attivano le cellule NK. Le cellule NK attivate producono l'IFN-γ, che a sua volta attiva i macrofagi a uccidere i batteri fagocitati. In questo modo, le cellule NK forniscono una prima linea di difesa, che contiene l'infezione in attesa dello sviluppo dell'immunità specifica. L'efficacia di questo meccanismo è dimostrata da dati ottenuti in topi con immunodeficienza grave combinata, privi cioè di linfociti T e B, nei quali l'infezione causata dal batterio intracellulare chiamato *Listeria monocytogenes* è inizialmente controllata tramite la produzione di IFN-γ da parte delle cellule NK. L'immunità innata può limitare solo temporaneamente la crescita batterica, non essendo in genere capace di eradicare le infezioni. Da qui la necessità dell'intervento dell'immunità specifica cellulo-mediata.

Immunità specifica ai batteri intracellulari

La principale risposta protettiva contro i batteri intracellulari è rappresentata dal reclutamento e dall'attivazione dei fagociti a opera dei linfociti T (immunità cellulare). I soggetti con deficit dell'immunità cellulare, come i pazienti affetti da AIDS, sono estremamente vulnerabili alle infezioni da batteri intracellulari (oltre che da miceti intracellulari e virus). Molte delle importanti caratteristiche dell'immunità cellulare sono state identificate negli anni ′50 del 1900 grazie a studi sulle risposte immunitarie al batterio intracellulare *Listeria monocytogenes* nel topo. Questa forma di immunità poteva essere trasferita in modo adottivo usando cellule linfoidi ottenute da animali infettati o vaccinati, ma non tramite il siero immune (vedi Fig. 10-2).

Come discusso nei Capitoli 10 e 11, i linfociti T ci difendono dalle infezioni usando due tipi di reazioni: 1) l'attivazione dei fagociti da parte dei linfociti T $CD4^+$ che è mediata dal ligando del CD40 e dall'IFN-γ e porta all'uccisione dei microrganismi ingeriti che sopravvivono al loro interno e 2) la lisi delle cellule infettate da parte dei linfociti T citotossici (*Cytotoxic T Lymphocytes*, CTL) $CD8^+$, che eliminano i microrganismi sfuggiti ai meccanismi di uccisione dei fagociti. Sotto l'influenza dell'IL-12 prodotta dai macrofagi e dalle DC, i linfociti T $CD4^+$ si differenziano in cellule effettrici T_H1. I linfociti T esprimono il ligando del CD40 e producono l'IFN-γ, due stimoli che attivano nei macrofagi la produzione di sostanze microbicide, come le specie reattive tossiche dell'ossigeno, il monossido di azoto e gli enzimi lisosomiali. Inoltre, nel topo, l'IFN-γ stimola la produzione di isotipi anticorpali che attivano il complemento e opsonizzano i batteri per la fagocitosi, integrando le funzioni effettrici dei macrofagi. Gli stimoli responsabili della produzione di questi anticorpi nell'uomo non sono ancora ben definiti. L'importanza dell'IL-12 e dell'IFN-γ nell'immunità ai batteri intracellulari è stata dimostrata in numerosi modelli sperimentali e nelle immunodeficienze congenite. Per esempio, individui che presentano mutazioni ereditarie a carico dei recettori per l'IFN-γ o per l'IL-12 sono estremamente suscettibili a infezioni con micobatteri atipici.

I batteri fagocitati stimolano la risposta dei linfociti T $CD8^+$ se gli antigeni batterici vengono trasportati dai fagosomi al citosol o se i batteri fuoriescono dai fagosomi penetrando al citoplasma delle cellule infettate. Nel citosol, i microrganismi non sono più suscettibili ai meccanismi microbicidi dei fagociti e l'infezione può essere eradicata solo mediante l'uccisione della cellula infettata da parte dei CTL. Quindi, le cellule effettrici dell'immunità cellulare, ossia i linfociti T $CD4^+$, i macrofagi e i linfociti $CD8^+$ CTL, che dai T $CD4^+$ stessi sono attivati, agiscono sinergicamente nella difesa nei confronti dei batteri intracellulari (Fig. 16-5).

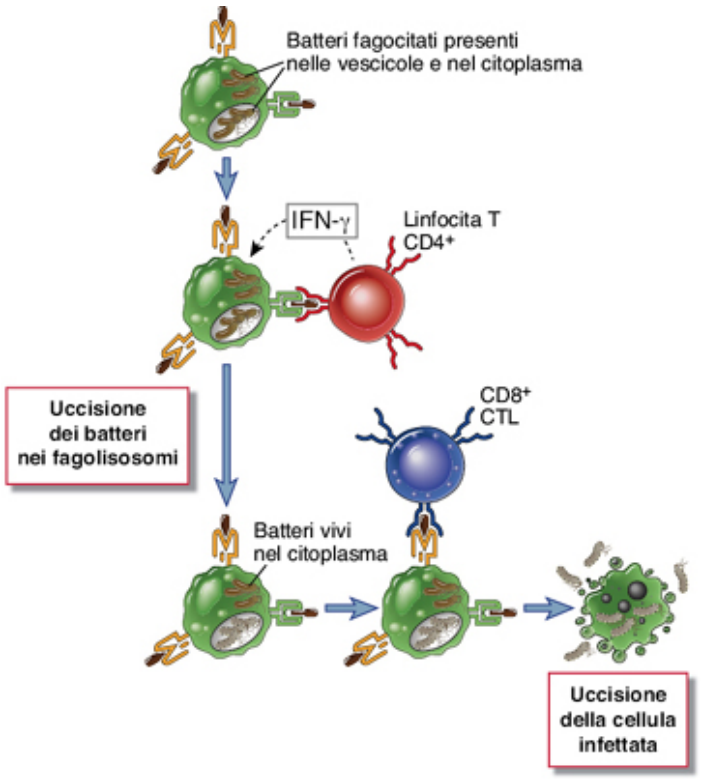


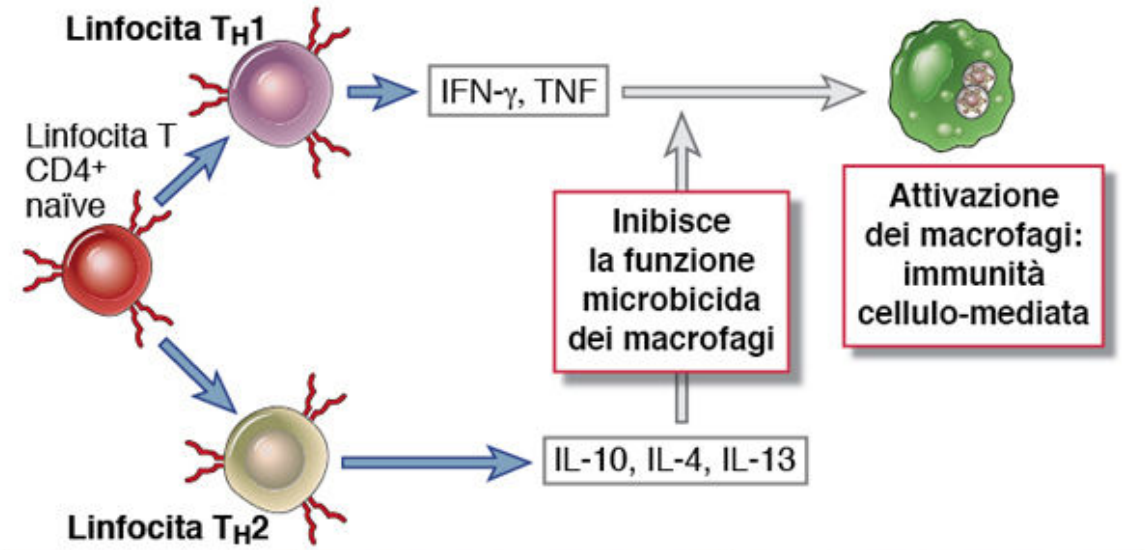
FIGURA 16-5 Cooperazione tra linfociti T CD4$^+$ e CD8$^+$ nella difesa contro i microrganismi intracellulari. I batteri intracellulari come *Listeria monocytogenes* vengono fagocitati dai macrofagi, all'interno dei quali riescono però a sopravvivere, prima nei fagosomi e poi nel citoplasma. I linfociti T CD4$^+$ rispondono agli antigeni peptidici dei batteri intravescicolari che vengono associati a molecole MHC di classe II, producendo l'IFN-γ, che a sua volta attiva la capacità battericida dei macrofagi a livello dei fagosomi. I linfociti T CD8$^+$ rispondono ai peptidi originati dagli antigeni citosolici che vengono associati alle molecole MHC di classe I, uccidendo le cellule infettate.

L'attivazione dei macrofagi in risposta ai microrganismi intracellulari può anche scatenare un danno tissutale. Questo danno può manifestarsi come reazione di ipersensibilità di tipo ritardato (*Delayed-Type Hypersensitivity*, DTH) verso antigeni proteici microbici (vedi Cap. 19). Dal momento che i batteri intracellulari si sono evoluti per resistere all'uccisione all'interno dei fagociti, essi spesso persistono per lunghi periodi e causano un'attivazione cronica dei linfociti T e dei macrofagi che può portare alla formazione di granulomi (vedi Fig. 19-8). La caratteristica istologica dell'infezione da parte di alcuni batteri intracellulari è infatti l'infiammazione granulomatosa. Questo tipo di reazione ha lo scopo di contenere l'infezione e prevenire la diffusione dei microrganismi, ma può anche causare un grave danno funzionale dovuto a necrosi e fibrosi tissutale.

La tubercolosi è un esempio di infezione causata da batteri intracellulari in cui l'immunità protettiva e l'ipersensibilità coesistono, e le lesioni patologiche sono provocate principalmente dalla risposta dell'ospite. Nell'infezione primaria da *Micobacterium tuberculosis*, i bacilli si moltiplicano lentamente nei polmoni e causano solo una lieve infiammazione, in quanto quest'ultima è tenuta sotto controllo dai macrofagi alveolari (e probabilmente dalle DC). Oltre il 90% dei pazienti infetti resta asintomatico, ma i batteri sopravvivono nei polmoni, soprattutto all'interno dei macrofagi. Circa 6-8 settimane dopo l'infezione, i macrofagi raggiungono i linfonodi drenanti causando l'attivazione dei linfociti T $CD4^+$, mentre i linfociti T $CD8^+$ possono essere attivati successivamente. I linfociti T $CD4^+$ producono l'IFN-γ, che attiva i macrofagi e aumenta la loro capacità di uccidere i bacilli fagocitati. Anche il TNF prodotto dai linfociti T e dai macrofagi svolge un ruolo importante nell'infiammazione locale e nell'attivazione dei macrofagi. La risposta T-dipendente riesce a impedire la disseminazione batterica; tuttavia, *M. tuberculosis* è in grado di sopravvivere all'interno dei macrofagi poiché le componenti della sua parete cellulare inibiscono la fusione dei lisosomi con i fagosomi. Di conseguenza, i batteri continuano a stimolare i linfociti T. La prolungata attivazione di questi linfociti porta alla formazione di granulomi, caratterizzati da una zona centrale di necrosi, denominata necrosi caseosa, causata dai prodotti battericidi dei macrofagi, inclusi gli enzimi lisosomiali e i cataboliti tossici dell'ossigeno. I granulomi necrotizzanti e la fibrosi (esiti cicatriziali) che accompagnano l'infiammazione granulomatosa giocano un ruolo fondamentale nel danno tissutale e nella sintomatologia clinica della tubercolosi. Gli individui precedentemente infettati mostrano una reazione cutanea DTH alla stimolazione con una preparazione di antigene batterico definita derivato proteico purificato (*Purified Protein Derivative*, PPD). I bacilli possono sopravvivere per molti anni, anche senza manifestazioni cliniche evidenti, e l'infezione si può riattivare in qualsiasi momento, specialmente se la risposta immunitaria si indebolisce perdendo la capacità di tenere sotto controllo l'infezione.

Le differenze interindividuali nella risposta T linfocitaria ai batteri intracellulari sono un fattore importante nella progressione e nell'evoluzione clinica della malattia (Fig. 16-6). Il ruolo delle citochine prodotte dai T_H1 e dai T_H2 nel determinare l'evolversi di un'infezione è stato chiaramente dimostrato nel modello murino di infezione da *Leishmania major*,

un protozoo (discusso più avanti in questo capitolo). Un chiaro esempio della relazione esistente tra la risposta dei linfociti T e l'esito della malattia nell'uomo è la lebbra, causata da *Mycobacterium leprae*. Esistono due forme di questa malattia, la forma lepromatosa e quella tubercoloide, sebbene molti pazienti presentino situazioni intermedie meno delineate. Nella lebbra lepromatosa, i pazienti presentano un titolo elevato di anticorpi specifici, ma una debole risposta cellulo-mediata diretta verso gli antigeni di *M. leprae*. I micobatteri proliferano all'interno dei macrofagi, dove possono ritrovarsi in grande quantità. La crescita batterica e la persistente ma inadeguata attivazione macrofagica portano alla formazione di lesioni a carico della cute e dei tessuti sottostanti. Per contro, i pazienti con lebbra tubercoloide mostrano una forte immunità cellulare agli antigeni del micobatterio associata a una modesta risposta anticorpale. Questo diverso profilo di risposta si riflette nella formazione di granulomi attorno alle terminazioni nervose, che provocano un deficit sensoriale e lesioni secondarie della cute di origine traumatica, in assenza di un'apprezzabile distruzione tissutale e con un modesto numero di batteri presenti nelle lesioni. Una possibile spiegazione delle differenze di queste due forme di malattia causate dallo stesso microrganismo è la possibilità che esse rispecchino due diversi quadri di differenziazione e di produzione di citochine da parte dei linfociti T in diversi individui. Alcuni studi indicano che i pazienti con lebbra tubercoloide producono nelle lesioni l'IFN-γ e l'IL-2 (indicativi di un'attivazione dei linfociti T_H1), mentre i pazienti con lebbra lepromatosa producono quantità ridotte di IFN-γ con una conseguente parziale attivazione dell'immunità cellulare e l'incapacità di controllare la diffusione batterica.



Infezione	Risposta	Esito
Leishmania major	La maggior parte dei ceppi murini: T_H1	⇒ Guarigione
	Topi BALB/c: T_H2	⇒ Infezione disseminata
Mycobacterium leprae	Alcuni pazienti: T_H1	⇒ Lebbra tubercoloide
	Alcuni pazienti: T_H1 difettivo o T_H2 dominanti	⇒ Lebbra lepromatosa (elevata carica batterica)

FIGURA 16-6 Ruolo dei linfociti T e delle citochine nel determinare l'esito delle infezioni. I linfociti T $CD4^+$ naïve possono differenziarsi in linfociti T_H1, che attivano i fagociti a uccidere i batteri fagocitati, o in linfociti T_H2, che inibiscono la classica via di attivazione dei macrofagi. L'equilibrio tra queste due sottopopolazioni influenza l'esito delle infezioni, come evidenziato dall'infezione da *Leishmania* spp. nel topo e da *Mycobacterium leprae* nell'uomo.

Elusione delle risposte immunitarie da parte dei batteri intracellulari

I batteri intracellulari hanno sviluppato varie strategie per resistere all'eliminazione da parte dei fagociti (vedi Tab. 16-2), tra cui l'inibizione della formazione dei fagolisosomi e/o l'evasione verso il citosol (in questo modo i batteri sfuggono ai meccanismi microbicidi che agiscono principalmente all'interno dei lisosomi) oppure la distruzione/inattivazione delle sostanze microbicide, incluse le specie reattive tossiche dell'ossigeno. L'esito dell'infezione dipende dalla possibilità che i meccanismi microbicidi dei macrofagi stimolati dai linfociti T prevalgano sulla resistenza dei patogeni all'uccisione. La resistenza alla fagocitosi è alla base della capacità di questi

batteri di causare infezioni croniche che possono durare per anni, che spesso recidivano o si aggravano e che sono molto difficili da eradicare.

IMMUNITÀ AI MICETI

Le infezioni da miceti, chiamate anche micosi, rappresentano nell'uomo un'importante causa di malattia e mortalità. Alcune infezioni fungine sono endemiche e sono solitamente provocate dall'inalazione di spore di miceti presenti nell'ambiente. Altre infezioni sono definite opportunistiche poiché l'agente eziologico provoca solo lievi sintomi (o è addirittura innocuo) nei soggetti sani, mentre può infettare e causare gravi patologie negli individui immunodeficienti. La compromissione del sistema immunitario è il principale fattore che predispone a infezioni fungine clinicamente rilevanti e, per esempio, i deficit di neutrofili causati da un danno anatomico o funzionale del midollo osseo si accompagnano spesso a queste infezioni. Infezioni micotiche opportunistiche sono anche caratteristiche dell'immunodeficienza che caratterizza l'infezione con HIV e sono un possibile effetto collaterale dei deficit immunologici che accompagnano le nuove terapie per la cura dei tumori e per la prevenzione del rigetto dei trapianti. Queste condizioni inibiscono la funzione midollare, sopprimendo le risposte immunitarie. Una grave infezione micotica opportunistica associata all'AIDS è la polmonite da *Pneumocystis jiroveci*, ma anche molte altre infezioni contribuiscono alla morbilità e alla mortalità causate dai deficit del sistema immunitario.

L'uomo è soggetto all'infezione da parte di diverse specie di miceti che possono vivere sia a livello extracellulare sia all'interno dei fagociti. Per questo motivo, le risposte immunitarie a questi microrganismi sono spesso la combinazione delle risposte già descritte per i batteri sia extra- sia intracellulari. Le nostre conoscenze sull'immunità antifungina sono tuttavia molto più limitate rispetto all'immunità nei confronti di batteri e virus; questo è dovuto in parte alla scarsità di modelli animali di micosi e in parte al fatto che queste infezioni sono spesso limitate a individui che non sono in grado di allestire una risposta immunitaria efficace.

Immunità innata e specifica ai miceti

I principali mediatori dell'immunità innata contro i miceti sono i neutrofili e i macrofagi; infatti, i pazienti neutropenici sono estremamente sensibili alle infezioni da miceti opportunistici. I fagociti e le DC riconoscono gli organismi fungini attraverso i TLR e recettori di tipo lectinico chiamati **dectine** (vedi Cap. 4). I neutrofili sono in grado di liberare sostanze dotate di azione fungicida, come le specie reattive dell'ossigeno e gli enzimi lisosomiali. Inoltre, essi possono fagocitare i miceti distruggendoli a livello intracellulare. Nei macrofagi, i ceppi più virulenti di *Cryptococcus neoformans* inibiscono la produzione di citochine come il TNF e l'IL-12, stimolando invece la produzione di IL-10, con il risultato di inibire l'attivazione macrofagica.

L'immunità cellulo-mediata rappresenta il principale meccanismo di immunità specifica nei confronti delle infezioni micotiche. *Histoplasma capsulatum*, un parassita intracellulare opportunistico che vive nei macrofagi, viene eliminato attraverso i medesimi meccanismi utilizzati per eliminare i batteri intracellulari. I linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$ cooperano per eliminare *Cryptococcus neoformans*, un lievito che tende a colonizzare i polmoni e il sistema nervoso centrale in soggetti immunodeficienti. *Pneumocystis jiroveci* è un altro micete che causa infezioni gravi nei soggetti con deficit dell'immunità cellulo-mediata.

Numerosi miceti extracellulari stimolano intense risposte T_H17 che sono, almeno in parte, indotte dalla attivazione delle DC da glucani di origine micotica che legano il dectin-1, un recettore specifico per questo polisaccaride fungino. Le cellule dendritiche attivate attraverso questo recettore lectinico producono IL-6 e IL-23, ossia citochine che stimolano la differenziazione dei T linfociti in senso T_H17 (vedi Cap. 10). Le cellule T_H17 stimolano l'infiammazione, i neutrofili e monociti reclutati eliminano i miceti. Individui con deficit delle risposte T_H17 sono suscettbili a infezioni mucocutanee croniche da *Candida*. Le risposte T_H1 sono protettive nei confronti delle infezioni micotiche intracellulari, come l'istoplasmosi; tuttavia, queste risposte possono indurre un'infiammazione granulomatosa, che rappresenta un'importante causa di danno tissutale in queste infezioni. I miceti, infine, possono anche stimolare una specifica risposta anticorpale che può essere protettiva.

IMMUNITÀ AI VIRUS

I virus sono microrganismi intracellulari che usano i componenti degli acidi nucleici e i meccanismi di sintesi proteica dell'ospite per replicarsi e propagarsi. I virus sono in grado di penetrare e infettare vari tipi cellulari usando come recettori molecole di superficie espresse fisiologicamente dalle cellule. Una volta penetrati nella cellula, i virus possono causare danno tissutale e malattia mediante numerosi meccanismi. La replicazione virale interferisce con la sintesi proteica e le normali funzioni della cellula, danneggiandola e infine portandola a morte. In questo caso, l'infezione è definita "litica" perché induce la lisi della cellula infettata, e l'effetto del virus viene definito citopatico. I virus non citopatici possono invece causare infezioni latenti, discusse più avanti nel capitolo.

Le risposte innate e specifiche ai virus mirano a bloccare l'infezione eliminando le cellule infettate (Fig. 16-7). L'infezione viene contenuta a opera degli IFN di tipo I, per quanto riguarda l'immunità innata, e da anticorpi neutralizzanti per quanto riguarda quella specifica. Una volta che l'infezione si è verificata, le cellule infettate sono eliminate utilizzando meccanismi propri sia della immunità innata (NK) sia di quella specifica (CTL).

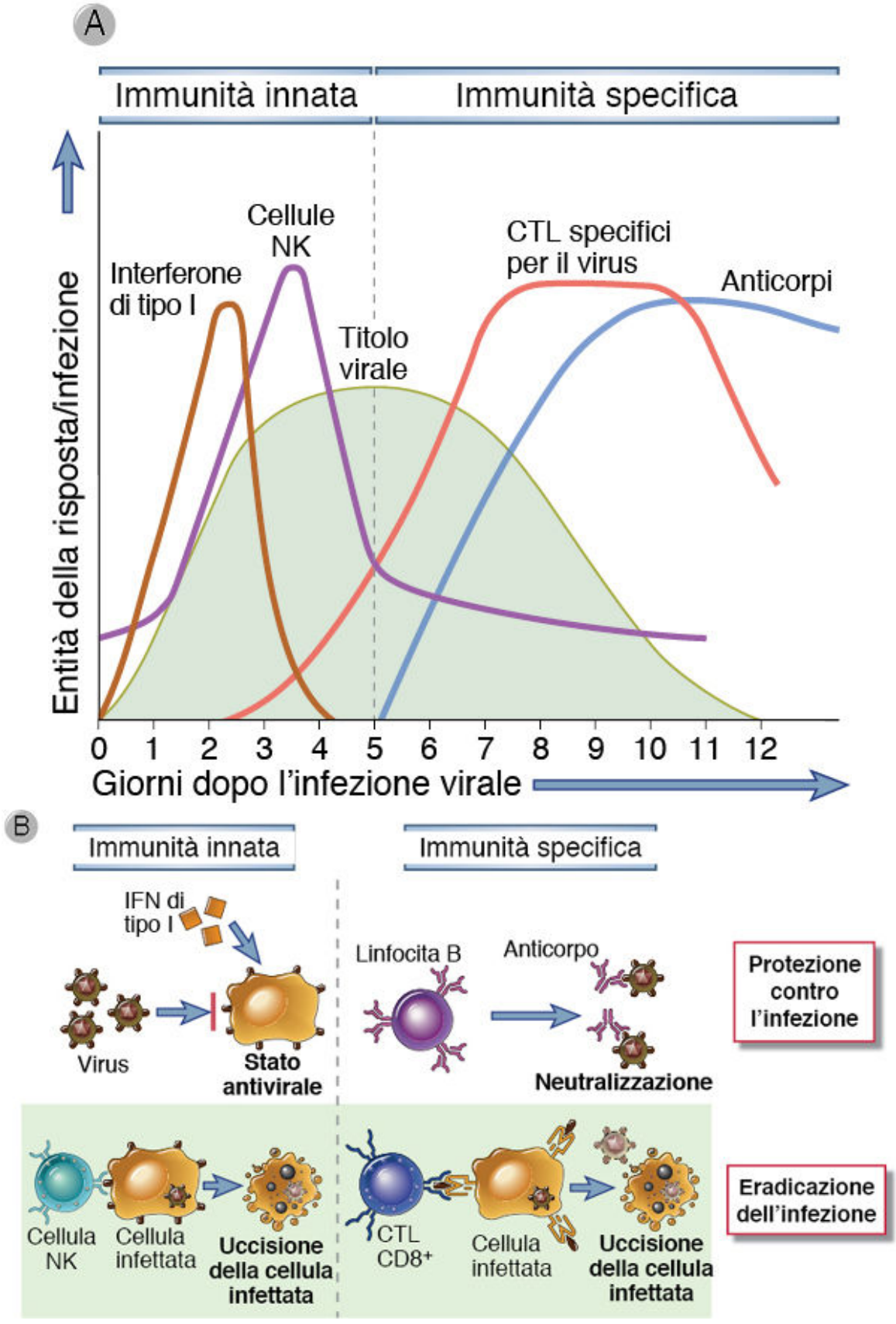

A
Immunità innata
Immunità specifica
Entità della risposta/infezione
Interferone di tipo I
Cellule NK
Titolo virale
CTL specifici per il virus
Anticorpi
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Giorni dopo l'infezione virale
B
Immunità innata
Immunità specifica
IFN di tipo I
Virus
Stato antivirale
Linfocita B
Anticorpo
Neutralizzazione
Protezione contro l'infezione
Cellula NK
Cellula infettata
Uccisione della cellula infettata
CTL CD8+
Cellula infettata
Uccisione della cellula infettata
Eradicazione dell'infezione

FIGURA 16-7 Risposte immunitarie innate e specifiche ai virus. A. Cinetica delle risposte dell'immunità innata e specifica contro un'infezione virale. **B.** Meccanismi attraverso i quali l'immunità innata e quella specifica prevengono ed eradicano le infezioni virali. L'immunità innata si esplica con gli IFN di tipo I, che ostacolano l'infezione, e con le cellule NK, che eliminano le cellule infettate. L'immunità specifica è esercitata dagli anticorpi e dai CTL che hanno il compito, rispettivamente, di bloccare l'infezione e di eliminare le cellule infettate.

Immunità innata ai virus

I principali meccanismi dell'immunità innata ai virus sono l'inibizione dell'infezione da parte degli IFN di tipo I e l'uccisione delle cellule infettate da parte delle cellule NK. L'infezione virale è associata alla produzione di IFN di tipo I da parte delle cellule infettate, con un ruolo di primaria importanza esercitato dalle DC plasmacitoidi (vedi Cap. 4). La produzione di IFN (Fig. 4-16) è attivata da diversi segnali biochimici quali il legame del RNA e del DNA virale ai TLR endosomiali, l'attivazione da parte dell'RNA virale dei recettori citoplasmatici RIG-like (*Retinoid-Inducible Gene*), e STING da parte del DNA virale. Le vie di trasduzione del segnale innescate dai TLR e dai sensori citoplasmatici convergono sull'attivazione delle chinasi, che attivano i fattori di trascrizione IRF (*Interferon Regulatory Factors*) che, a loro volta, stimolano la trascrizione dei geni che codificano per gli IFN di tipo I. Questi hanno la funzione di inibire la replicazione virale (sia nelle cellule infettate sia in quelle ancora indenni). I meccanismi mediante i quali gli interferoni bloccano la replicazione virale sono stati discussi nel Capitolo 4 (vedi Fig. 4-17).

Le cellule NK uccidono le cellule infettate e costituiscono un importante meccanismo di difesa durante le prime fasi dell'infezione virale, prima che intervengano le risposte specifiche. L'espressione delle molecole MHC di classe I è spesso ridotta nelle cellule infettate da virus; ciò permette loro di sfuggire al riconoscimento da parte dei CTL ma le rende suscettibili alla azione litica delle cellule NK poiché l'assenza di queste molecole rimuove il segnale inibitorio a cui le cellule NK sono sottoposte (vedi Cap. 4, Fig. 4-7).

Immunità specifica ai virus

L'immunità specifica alle infezioni virali è mediata dagli anticorpi (che bloccano il legame e l'ingresso del virus all'interno delle cellule bersaglio) e dai CTL (che eradicano l'infezione uccidendo le cellule infettate) (vedi Fig. 16-7). Gli anticorpi più efficienti sono quelli ad alta affinità prodotti nelle aree T-dipendenti dei centri germinativi (vedi Cap. 12). Gli anticorpi sono efficaci

contro i virus solo in due momenti specifici dell'infezione: nella fase precoce dell'infezione (che solitamente coincide con la presenza del virus a livello extracellulare, prima del sua ingresso nelle cellule bersaglio infettate) oppure quando un virus citopatico viene liberato in seguito alla lisi delle cellule infettate. In effetti, gli anticorpi antivirali svolgono principalmente un'azione neutralizzante prevenendo l'adesione e l'ingresso del virus nella cellula bersaglio. Ciò si esplica attraverso il loro legame all'envelope virale o agli antigeni del capside. In questo modo, gli anticorpi prevengono sia l'inizio dell'infezione sia la diffusione da cellula a cellula. Le IgA secretorie svolgono un ruolo fondamentale nella neutralizzazione dei virus che penetrano attraverso la mucosa respiratoria e intestinale. L'immunizzazione orale nei confronti del poliovirus agisce proprio inducendo l'immunità a livello delle mucose. Oltre alla neutralizzazione, gli anticorpi possono opsonizzare le particelle virali promuovendone la rimozione a opera delle cellule fagocitiche. Infine, l'attivazione del complemento può partecipare all'immunità virale anticorpo-mediata, principalmente promuovendo la fagocitosi, ma probabilmente anche favorendo la lisi dei virioni dotati di un envelope lipidico.

L'importanza dell'immunità umorale nella difesa contro le infezioni virali è suffragata dall'osservazione che la resistenza a un particolare virus indotta da un'infezione o da una vaccinazione è specifica per un determinato sierotipo virale, definibile con gli anticorpi. Ne è un tipico esempio il virus dell'influenza, in cui l'esposizione a un certo tipo sierologico non conferisce resistenza agli altri sierotipi virali. Gli anticorpi neutralizzanti bloccano l'infezione delle cellule bersaglio e la diffusione del virus da cellula a cellula, ma una volta che il virus è già penetrato nella cellula e ha iniziato a replicarsi esso diventa inaccessibile agli anticorpi. Quindi, l'immunità umorale prodotta da una precedente infezione o vaccinazione è in grado di proteggere da un'infezione virale, ma non di eradicare un'infezione già in corso.

L'eliminazione dei virus che risiedono all'interno della cellula è mediata dai CTL, che uccidono le cellule infettate. Come abbiamo ricordato nei capitoli precedenti, la principale funzione dei CTL è la sorveglianza contro le infezioni virali. Molti CTL virus-specifici sono linfociti T $CD8^+$ che riconoscono i peptidi virali citosolici, solitamente sintetizzati all'interno della cellula ed espressi sulla superficie della stessa in associazione a molecole MHC di classe I. Se la cellula infettata è una semplice cellula tissutale e non una cellula che presenta l'antigene (*Antigen Presenting Cell*, APC)

professionale, come per esempio una DC, essa può essere fagocitata dalle DC stesse, che provvedono al processamento degli antigeni virali e alla loro presentazione ai linfociti T $CD8^+$ naïve. Questo processo di presentazione crociata (*cross-priming*) è stato già descritto nel Capitolo 6 (vedi Fig. 6-20). La completa differenziazione dei $CD8^+$ CTL necessita spesso di citochine prodotte dai linfociti T helper $CD4^+$ o di molecole costimolatorie espresse dalle cellule infettate (vedi Cap. 11). Come descritto nei Capitoli 9 e 11, nel corso di un'infezione virale i linfociti T $CD8^+$ vanno incontro a una massiccia proliferazione e la maggior parte delle cellule generate è specifica per un ristretto numero di peptidi virali. Alcuni dei linfociti T attivati si differenziano in CTL effettori, in grado di uccidere qualsiasi cellula infettata da quel determinato virus. Gli effetti antivirali dei CTL sono principalmente dovuti alla loro capacità di uccidere le cellule infettate; tuttavia, altri meccanismi possono contribuire alla loro azione antivirale, inclusa l'attivazione di nucleasi, che possono degradare il genoma virale, e la secrezione di citochine antivirali, come l'IFN-γ, che attivano i fagociti e possono svolgere una certa attività antivirale.

L'importanza dei CTL nella difesa contro le infezioni virali è dimostrata dall'aumentata predisposizione alle infezioni che si osserva nei pazienti e negli animali che presentano deficit di linfociti T. Inoltre, è stato sperimentalmente dimostrato che nel topo è possibile conferire protezione verso alcune infezioni virali mediante il trasferimento adottivo di CTL virus-specifici, ristretti per MHC di classe I. Infine, nonostante molti virus modifichino i propri antigeni di superficie (principalmente le glicoproteine dell'envelope) per sfuggire all'attacco da parte degli anticorpi, le cellule infettate possono esprimere proteine virali invarianti, cosicché la difesa mediata dai CTL rimane efficace contro questi virus.

Nelle infezioni latenti, il DNA virale persiste nella cellula ospite senza che il virus vada incontro a replicazione e senza che uccida la cellula infettata. La latenza è spesso uno stato di equilibrio tra l'infezione e la risposta immunitaria. I CTL generati in risposta al virus possono controllare l'infezione senza tuttavia eradicarla. Come risultato, il virus persiste nelle cellule infettate, talvolta per l'intera vita dell'individuo. Ogni situazione in cui la risposta immunitaria dell'ospite è compromessa può portare alla riattivazione dell'infezione latente, con l'espressione di geni virali che sono responsabili degli effetti citopatici e della diffusione del virus, effetti che comprendono la

lisi o la proliferazione incontrollata delle cellule infettate. Tali infezioni latenti sono comuni al virus di Epstein-Barr e a diversi virus a DNA della famiglia degli herpes virus.

In alcune infezioni virali, in particolare da virus non citopatici, il danno tissutale può essere causato dai CTL. Un modello sperimentale murino di tale fenomeno è rappresentato dall'infezione da virus della coriomeningite linfocitaria (*Lymphocytic ChorioMeningitis Virus*, LCMV), che induce un processo infiammatorio a carico delle meningi e del midollo spinale. L'LCMV infetta le cellule meningee, ma non è citopatico e non le danneggia direttamente. L'infezione stimola però lo sviluppo di CTL virus-specifici che distruggono le cellule meningee infettate nel tentativo di eradicarla. I topi privi di linfociti T, quando vengono infettati con l'LCMV, diventano portatori cronici del virus, in assenza di lesioni patologiche, mentre l'infezione con lo stesso virus provoca lo sviluppo di leptomeningite nei topi normali. È interessante notare come quest'osservazione contraddica apparentemente la regola per cui gli individui immunodeficienti sono più suscettibili alle malattie infettive rispetto a quelli sani. Nell'uomo, l'infezione da virus dell'epatite B (HBV) mostra alcune similitudini con quella da LCMV del topo: gli individui immunodeficienti si infettano ma non sviluppano la malattia e diventano portatori cronici in grado di trasmettere l'infezione ad altri soggetti sani. Il fegato dei pazienti con epatite acuta e cronica contiene un numero elevato di linfociti T $CD8^+$ ed è possibile isolare e coltivare *in vitro* CTL ristretti per MHC di classe I, HBV-spcifici a partire da campioni bioptici ottenuti da questi pazienti.

Le risposte immunitarie alle infezioni virali possono contribuire alla patogenesi anche in altro modo (vedi Cap. 19). Una conseguenza dell'infezione persistente da parte di alcuni virus, come quello dell'epatite B, è la formazione di immunocomplessi circolanti composti da antigeni virali e anticorpi specifici, che si depositano nei vasi causando vasculiti sistemiche. Inoltre, alcune proteine virali contengono sequenze aminoacidiche condivise con alcuni antigeni self ed è stato ipotizzato che, a causa di questo "mimetismo molecolare", l'immunità antivirale possa innescare risposte contro gli antigeni self.

Elusione delle risposte immunitarie da parte dei virus

I virus hanno sviluppato diversi meccanismi per eludere le difese immunitarie dell'ospite (Tab. 16-3).

TABELLA 16-3 Meccanismi di elusione della risposta immunitaria da parte dei virus

Meccanismo di elusione	Esempi
Modificazione degli antigeni	Influenza, rhinovirus, HIV
Inibizione della processazione dell'antigene	
Blocco del trasportatore TAP	Herpes simplex virus (HSV)
Rimozione delle molecole MHC classe I del RE	Citomegalovirus (CMV)
Produzione di molecole MHC solubili che fungono da "esca" per inibirele cellule NK	Citomegalovirus (murino)
Produzione di omologhi dei recettori per le citochine	Virus vaccino, poxvirus IL-1, IFN-γ Citomegalovirus (chemochine)
Produzione di citochine immunosoppressive	Virus di Epstein-Barr (IL-10)
Infezione, uccisione o inattivazione di cellule immunocompetenti	HIV
Inibizione dell'attivazione del complemento	
Reclutamento del fattore H	HIV
Incorporazione di CD59 nell'envelope virale	HIV, virus vaccino, CMV
Inibizione dell'immunità innata	
Inibizione dell'interazione con il sensore RNA RIG-I	Virus vaccino, HIV
Inibizione di PKR (trasduzione del segnale da parte del recettore IFN	HIV, HCV, HSV, polio

Sono riportati esempi rappresentativi dei differenti meccanismi utilizzati dai virus per resistere alle difese immunitarie dell'ospite.
RE, reticolo endoplasmatico; HCV, virus dell'epatite C; HIV, virus dell'immunodeficienza umana; TAP, trasportatore associato con la processazione dell'antigene.

- ***I virus possono modificare i loro antigeni cessando così di essere riconosciuti dalle cellule immuni.*** Gli antigeni coinvolti in questo fenomeno sono solitamente le glicoproteine di superficie (il bersaglio preferenziale degli anticorpi), ma anche gli epitopi riconosciuti dai linfociti T possono andare incontro a mutazione. Il principale tipo di mutazione antigenica è quello puntiforme, ma nel caso di virus a RNA si possono osservare anche riarrangiamenti dell'RNA genomico, che danno luogo ai fenomeni di deriva (*drift*) antigenica. Questi processi sono molto importanti nella diffusione del virus dell'influenza. In questo caso, i due principali antigeni virali sono l'emoagglutinina trimerica virale (la proteina virale spike) e la neuraminidasi. I genomi del virus vanno incontro a mutazioni nei geni che codificano per queste proteine di superficie e la variazione che ne risulta è chiamata **deriva antigenica**. I genomi a RNA segmentato dei virus influenzali, che normalmente vivono in diverse specie, possono andare incontro a ricombinazione nelle cellule dell'ospite e, così riarrangiati, possono differire in maniera anche molto profonda dai ceppi originari e prevalenti (Fig. 16-8). Il riarrangiamento dei geni virali causa una modificazione importante della struttura dell'antigene, chiamata **shift antigenico**, che genera "nuovi" virus come quelli dell'influenza aviaria e dell'influenza suina. Grazie alla modificazione degli antigeni, un virus può divenire resistente all'immunità generata da un'epidemia precedente. Le pandemie influenzali del 1918, del 1957 e del 1968 furono effettivamente causate da ceppi influenzali che derivavano da processi di shift antigenico. La pandemia da H1N1 del 2009 è stata causata da un ceppo nel quale l'RNA del genoma virale si era riarrangiato con quello di ceppi endemici nel maiale, nel pollo e nell'uomo. Va comunque notato come nei virus si originino in continuazione varianti sierologiche caratterizzate da mutazioni antigeniche minori. Ci sono, per esempio, così tanti sierotipi di rhinovirus che una strategia vaccinale preventiva contro il raffreddore comune è attualmente irrealizzabile. Il virus dell'immunodeficienza umana 1 (HIV-1), che causa l'AIDS, è caratterizzato da una straordinaria capacità di variare i propri antigeni a causa dei moltissimi errori che si verificano quando il suo genoma a RNA è retrotrascritto nel corso della replicazione virale (vedi Cap. 20); in queste condizioni, la profilassi vaccinale dovrebbe essere diretta contro proteine virali conservate.

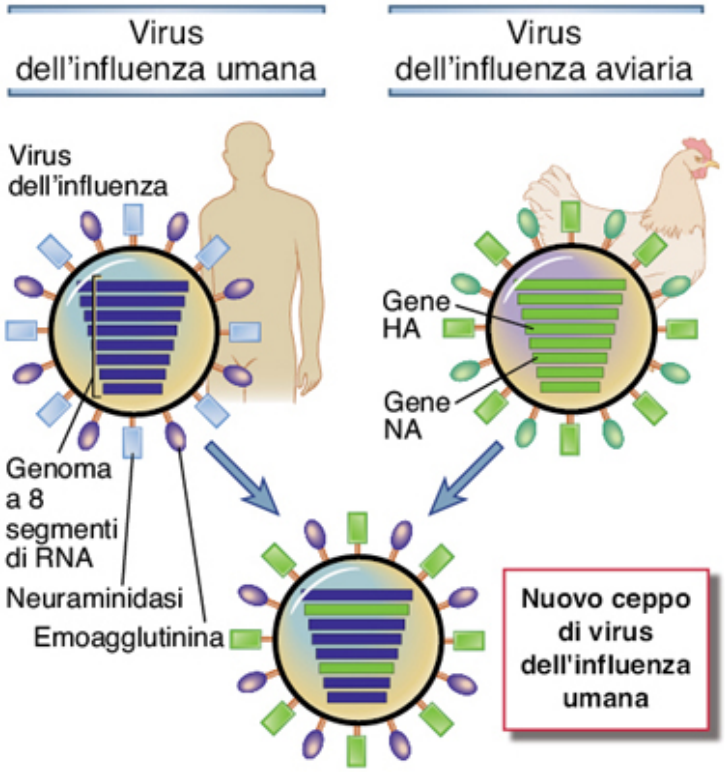


FIGURA 16-8 Generazione di nuovi ceppi di virus influenzale a causa della ricombinazione genetica (*antigenic shift*). Il genoma del virus dell'influenza è composto da 8 diverse catene di RNA che possono andare incontro a ricombinazione genetica mediante il riarrangiamento dei segmenti in svariati ospiti come il maiale (non mostrato in figura), i volatili o l'uomo, che siano contemporaneamente infettati dai due ceppi virali. Questi riarrangiamenti genetici creano nuovi virus che sono antigenicamente distinti dai loro precursori e possono eludere la risposta immunitaria nella maggior parte dei casi di nuova infezione. Il virus dell'influenza H1N1, responsabile della pandemia del 2009, deriva dal riarrangiamento dei virus suino, aviario e umano nei maiali, con creazione di un nuovo ceppo virale che è stato e poi trasmesso all'uomo.

- ***Alcuni virus impediscono l'associazione dei loro antigeni proteici citosolici con molecole MHC di classe I***. I virus producono una vasta gamma di proteine che possono bloccare diverse fasi nel processamento, trasporto e presentazione dell'antigene (Fig. 16-9). L'inibizione della presentazione dell'antigene blocca l'assemblaggio e l'espressione in membrana di molecole MHC di classe I stabili e quindi la presentazione dei peptidi virali. Ne consegue, che le cellule infettate non possono essere riconosciute e uccise dai CTL $CD8^+$. Come discusso precedentemente, le cellule NK possono rappresentare una risposta dell'ospite per riuscire a uccidere queste cellule poiché esse si attivano in seguito all'assenza delle molecole MHC di classe I sulla membrana della cellula bersaglio. Alcuni

virus possono però produrre proteine che si comportano da ligandi per i recettori inibitori delle cellule NK, impedendone quindi l'attivazione.

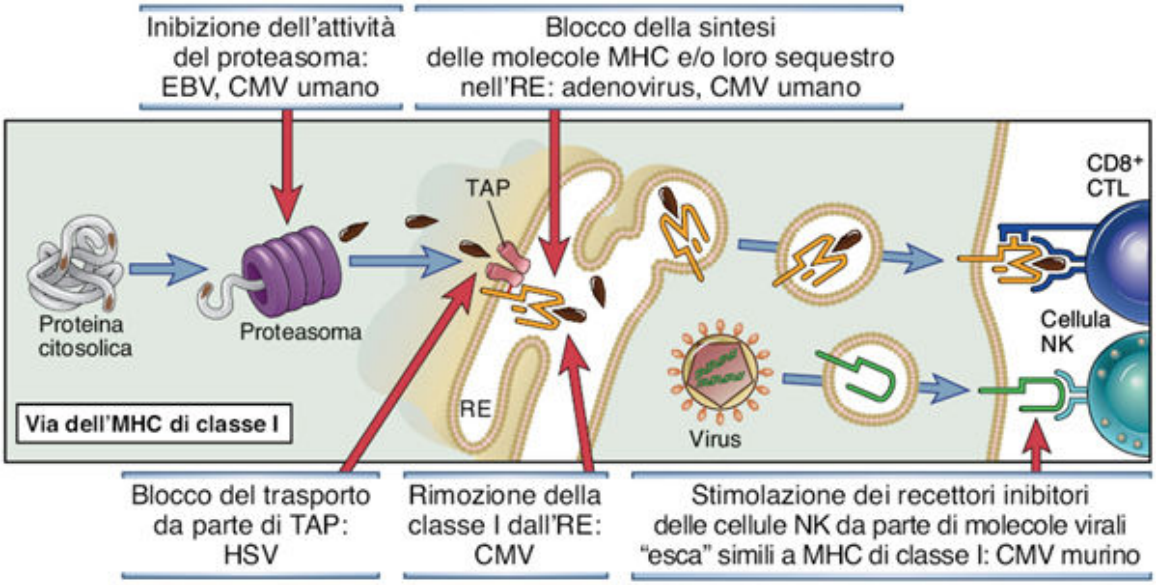


FIGURA 16-9 Meccanismi mediante i quali i virus inibiscono la processazione e la presentazione dell'antigene. Nella figura è indicata la via di presentazione dell'antigene associata a molecole MHC di classe I, con esempi di virus che bloccano le diverse fasi del processo. Oltre a interferire con il riconoscimento dei linfociti T $CD8^+$, alcuni virus producono molecole MHC "esca" che stimolano i recettori inibitori delle cellule NK (*Natural Killer*). CMV, citomegalovirus; EBV, virus di Epstein-Barr; HSV, virus herpes simplex; RE, reticolo endoplasmatico; TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*), trasportatore associato con il processamento dell'antigene.

- ***Alcuni virus producono molecole che inibiscono le risposte immunitarie***. I poxvirus codificano molecole che vengono rilasciate dalle cellule infettate e che legano diverse citochine, come l'IFN-γ, il TNF, l'IL-1, l'IL-18 e molte chemochine, agendo quindi da antagonisti recettoriali competitivi. Alcuni citomegalovirus producono una molecola omologa all'MHC di classe I che può competere per il legame e la presentazione degli antigeni. Il virus di Epstein-Barr produce una proteina omologa all'IL-10, dotata di azione soppressiva sui macrofagi, che può quindi agire inibendo la funzione macrofagica e l'immunità cellulo-mediata. Questi esempi rappresentano probabilmente solo una piccola parte delle strategie attuate dai virus per sopprimere la risposta immunitaria. L'esistenza di queste molecole suggerisce che nel corso dei loro ripetuti passaggi nell'ospite i virus abbiano acquisito geni codificanti

per inibitori endogeni della risposta immunitaria, evolvendosi così per infettare e colonizzare l'uomo con maggiore aggressività.

- ***Alcune infezioni virali croniche si accompagnano a deficit della risposta CTL***, che permette quindi la persistenza del virus. Studi condotti sulla coriomeningite linfocitaria murina cronica hanno dimostrato che questo tipo di deficit immunitario può essere secondario all'attivazione di segnali inibitori nei confronti dei linfociti T. Ciò è causato dalla stimolazioni di recettori quali PD-1 (*Programmed Death 1*) che, in condizioni fisiologiche sono deputati a mantenere la tolleranza nei confronti degli antigeni self. (vedi Fig. 11-3). Si può quindi concludere che i virus hanno imparato a trarre giovamento dai meccanismi fisiologici di regolazione delle risposte immunitarie e a utilizzarli a loro vantaggio durante l'infezione. Questo fenomeno è stato chiamato esaurimento della risposta *(exhaustion)*, dunque, le risposte contro un virus vengono avviate ma si interrompono prematuramente. Il fenomeno dell'*exhaustion* della risposta dei linfociti T $CD8^+$ è stato osservato in patologie quali l'infezione da HIV e da virus dell'epatite.
- ***I virus possono infettare, uccidere o inattivare le cellule immunocompetenti***. Un ovvio esempio è il virus dell'HIV, che infetta e uccide i linfociti T $CD4^+$, favorendo la progressione della infezione fino allo sviluppo di AIDS.

IMMUNITÀ AI PARASSITI

Nella terminologia microbiologica, il concetto di infestazione parassitaria si riferisce all'infezione di microrganismi come i protozoi, gli elminti e gli ectoparassiti (per esempio le zecche e gli acari). Soprattutto nei Paesi in via di sviluppo, questi parassiti sono responsabili di morbilità e mortalità molto superiori a quelle di altre categorie di microrganismi. Si calcola che circa il 30% della popolazione mondiale sia affetto da infezioni parassitarie. La malaria, da sola, colpisce più di 100 milioni di persone in tutto il mondo e ogni anno è responsabile di circa 700.000 (*N.d.C.*) decessi. L'entità di questo problema e il suo impatto sulla salute pubblica rappresentano la principale ragione del grande interesse per l'immunità verso i parassiti e dello sviluppo dell'immunoparassitologia come una branca distinta dell'immunologia.

La maggior parte dei parassiti presenta un complesso ciclo biologico, una parte del quale si verifica nell'uomo (o altri vertebrati), mentre un'altra si svolge in ospiti intermedi, quali mosche, zecche e lumache. L'uomo viene spesso infettato dalla puntura di un ospite intermedio o condividendo con questo un particolare habitat. Per esempio, la malaria e la tripanosomiasi sono trasmesse dalla puntura di un insetto, mentre la schistosomiasi è trasmessa dall'esposizione ad acque in cui vivono lumache infettate. Molte infezioni parassitarie cronicizzano come conseguenza del fatto che esse sono causate da parassiti che inducono una debole risposta immunitaria innata e sfuggono o resistono alla risposta immunitaria specifica. Infine, molti farmaci antiparassitari non riescono a uccidere i microrganismi in modo efficace. Come conseguenza, gli individui che vivono nelle aree endemiche spesso necessitano di terapie farmacologiche ripetute nel tempo; questo non è però sempre possibile a causa degli elevati costi dei trattamenti e della presenza di numerosi problemi logistici.

Immunità innata ai parassiti

Anche se molti protozoi ed elminti attivano diversi meccanismi dell'immunità innata, questi organismi riescono comunque a sopravvivere e moltiplicarsi nei loro ospiti poiché hanno acquisito la capacità di resistere alle difese immunitarie. La principale risposta innata ai protozoi è la fagocitosi, tuttavia molti di questi parassiti sono resistenti all'uccisione da parte dei fagociti e possono addirittura riprodursi all'interno dei macrofagi. Alcuni protozoi esprimono molecole di superficie che attivano i TLR espressi dai fagociti. Le specie *Plasmodium* (il protozoo responsabile della malaria), *Toxoplasma gondii* (l'agente della toxoplasmosi) e *Cryptosporidium* (il parassita che più frequentemente è causa di diarrea nei pazienti infettati da HIV) esprimono i residui lipidici glicosilfosfatidilinositoli che possono attivare il TLR2 e il TLR4. I fagociti possono combattere anche gli elminti secernendo sostanze microbicide che uccidono i microrganismi troppo grandi per essere fagocitati. Molti elminti sono tuttavia dotati di tegumenti che li rendono resistenti ai meccanismi citotossici dei neutrofili e dei macrofagi. Alcuni elminti, infine, possono attivare la via alternativa del complemento, benché, come vedremo più avanti, i parassiti isolati da un ospite infettato possono sviluppare la capacità di resistere alla lisi mediata dal complemento.

Immunità specifica ai parassiti

I protozoi e gli elminti si diversificano fortemente per quanto riguarda le proprietà strutturali e biochimiche, il ciclo vitale e i meccanismi patogenetici. Non sorprende quindi che parassiti diversi stimolino risposte immunitarie specifiche differenti (Tab. 16-4). Alcuni protozoi patogeni si sono evoluti per sopravvivere all'interno delle cellule dell'ospite e di conseguenza la protezione immunitaria contro questi microrganismi è mediata dagli stessi meccanismi deputati all'eliminazione dei batteri intracellulari e dei virus. Per contro, i metazoi come gli elminti sopravvivono nei tessuti extracellulari e la loro eliminazione spesso dipende dalla risposta anticorpale.

TABELLA 16-4 Risposte immunitarie ai parassiti patogeni

Parassita	Malattia	Principali meccanismi di protezione immunitaria
Protozoi		
Diverse specie di *Plasmodium*	Malaria	Anticorpi e CTL $CD8^+$
Leishmania donovani	Leishmaniosi (mucocutanea, disseminata)	Linfociti $CD4^+$ T_H1 che attivano i macrofagi per uccidere i parassiti fagocitati
Trypanosoma brucei	Tripanosomiasi africana	Anticorpi
Entamoeba histolytica	Amebiasi	Anticorpi, fagocitosi
Metazoi		
Diverse specie di *Schistosoma*	Schistosomiasi	Uccisione mediata dagli eosinofili, macrofagi
Filaria (per es. *Wuchereria bancrofti)*	Filariasi	Immunità cellulo-mediata; Anticorpi (?)

Nella tabella sono elencati alcuni parassiti con le principali risposte immunitarie dirette nei loro confronti.

Il principale meccanismo di difesa contro i protozoi che sopravvivono all'interno dei macrofagi è costituito dall'immunità cellulo-mediata, in particolare dall'attivazione dei macrofagi da parte delle citochine prodotte dai linfociti T_H1. L'infezione murina da *Leishmania major*, un protozoo che sopravvive negli endosomi dei macrofagi, è il migliore esempio di come la predominanza della risposta T_H1 o T_H2 condizioni la resistenza o la suscettibilità alla malattia (vedi Fig. 16-6). La resistenza all'infezione è

associata all'attivazione dei linfociti T_H1 $CD4^+$, che producono IFN-γ promuovendo l'eliminazione dei parassiti intracellulari da parte dei macrofagi. Al contrario, l'attivazione dei linfociti T_H2 si traduce in un'aumentata sopravvivenza del parassita e nell'esacerbazione del danno tissutale a causa dell'azione soppressiva delle citochine T_H2 sui macrofagi. Un esempio significativo di questa differenza è rappresentato dalle infezioni da *Leishmania* in diversi ceppi di topi inbred. La maggior parte dei ceppi di topi inbred è resistente all'infezione da *L. major*, ma i topi inbred BALB/c sono altamente suscettibili a questa infezione e muoiono se esposti a un'elevata quantità di parassiti. In risposta agli antigeni di *Leishmania*, i ceppi di topo resistenti producono elevati livelli di IFN-γ, mentre quelli suscettibili producono alte quantità di IL-4. L'attivazione di risposte T_H1 e/o l'inibizione di risposte T_H2 in ceppi suscettibili ne aumenta la resistenza alle infezioni. I meccanismi di questa notevole differenza tra ceppi diversi non sono stati ancora definiti.

I protozoi che si replicano all'interno della cellula, causandone la lisi, stimolano risposte anticorpali e citotossiche specifiche del tutto simili a quelle causate dai virus citopatici. Un esempio significativo è rappresentato dal parassita della malaria, che risiede prevalentemente negli eritrociti e negli epatociti durante il suo ciclo vitale. Per molti anni si è ritenuto che gli anticorpi fossero il principale meccanismo protettivo contro la malaria e i primi tentativi di vaccinazione miravano a generare una risposta anticorpale; sappiamo ora che la risposta citotossica contro i parassiti residenti negli epatociti costituisce un importante meccanismo di difesa contro la diffusione di questo protozoo intracellulare. La citochina IFN-γ risulta protettiva in numerose infezioni da protozoi, incluse la malaria, la toxoplasmosi e la criptosporidiosi.

La difesa contro molte infezioni elmintiche è dovuta all'attivazione di linfociti T_H2 che portano alla produzione di anticorpi IgE e all'attivazione degli eosinofili. Le infezioni elmintiche stimolano i linfociti T naïve $CD4^+$ a differenzarsi in senso T_H2, cellule effettrici, che secernono l'IL-4 e l'IL-5. L'IL-4 stimola la produzione di IgE, che si legano ai recettori Fcε degli eosinofili e dei mastociti. L'IL-5 stimola lo sviluppo e l'attivazione degli eosinofili. Le IgE rivestono i parassiti, gli eosinofili si legano alle IgE e rilasciano il contenuto dei loro granuli per uccidere gli elminti (vedi Cap. 20). L'azione combinata dei mastociti e degli eosinofili porta all'espulsione del parassita dall'intestino (vedi Fig. 10-9). L'espulsione dei nematodi intestinali è

dovuta a meccanismi non ancora ben definiti, che tuttavia sembrano dipendere dall'IL-4, ma non dalle IgE, come l'aumentata peristalsi intestinale.

Le risposte immunitarie specifiche ai parassiti possono anche causare un danno tissutale. In effetti, alcuni parassiti e i loro prodotti inducono risposte granulomatose accompagnate da fibrosi. Per esempio, le uova di *Schistosoma mansoni* depositate nel fegato stimolano i linfociti T $CD4^+$, che a loro volta attivano i macrofagi e inducono una risposta DTH, con conseguente formazione di granulomi attorno alle uova. Una caratteristica insolita di questi granulomi è la loro associazione a una risposta T_H2 (si ricordi a questo riguardo che i granulomi sono generalmente indotti da una risposta T_H1 contro antigeni persistenti; vedi Cap. 19). La funzione dei granulomi T_H2 è di circoscrivere le uova di schistosoma, ma la grave fibrosi che accompagna questo processo porta al sovvertimento della circolazione venosa nel fegato, all'ipertensione portale e alla cirrosi. Nella filariasi linfatica, la colonizzazione dei vasi linfatici da parte dei parassiti causa reazioni cellulo-mediate croniche e conseguente fibrosi; questo provoca ostruzione linfatica e grave linfedema. Le infezioni parassitarie croniche e persistenti si associano spesso alla formazione di immunocomplessi tra anticorpi e antigene del parassita che possono depositarsi nei vasi sanguigni e nei glomeruli renali, causando rispettivamente vasculiti e nefriti (vedi Cap. 19). Malattie da immunocomplessi si associano infatti frequentemente a schistosomiasi e malaria.

Elusione delle risposte immunitarie da parte dei parassiti

I parassiti sfuggono ai meccanismi protettivi dell'immunità riducendo la propria immunogenicità e inibendo le risposte immunitarie dell'ospite. Diversi parassiti hanno sviluppato meccanismi molto efficaci per resistere al sistema immunitario (Tab. 16-5).

TABELLA 16-5 Meccanismi di elusione della risposta immunitaria da parte dei parassiti

Meccanismo di elusione immunitaria	Esempi
Variazione degli antigeni	Tripanosomi, *Plasmodium*
Acquisizione della resistenza al complemento o ai CTL	Schistosomi
Inibizione delle risposte immunitarie	Filaria (a seguito dell'ostruzione linfatica), tripanosomi
Liberazione degli antigeni in forma solubile	Entamoeba

CTL (*Cytotoxic Lymphocytes*), linfociti T citotossici.

- Durante il loro ciclo vitale nell'ospite vertebrato, i parassiti modificano i loro antigeni di superficie. Sono state individuate due strategie diverse per variare il profilo antigenico. La prima consiste nel cambiamento dell'espressione antigenica a seconda dello stadio maturativo; in altri termini, nello stadio maturo tissutale il parassita esprime antigeni diversi da quelli espressi nello stadio infettivo. Per esempio, allo stadio infettivo di sporozoita, il parassita della malaria è antigenicamente distinto dai merozoiti che si insediano nell'ospite e sono responsabili dell'infezione cronica. Nel momento in cui il sistema immunitario genera una risposta all'infezione da sporozoiti, il parassita si è differenziato, esprime nuovi antigeni e non costituisce più un bersaglio per i meccanismi effettori della risposta immunitaria. La seconda e ancora più sorprendente strategia di variazione antigenica è costituita dalla continua variazione dei principali antigeni di superficie osservata nei tripanosomi africani, come *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma rhodesiense*. Questa continua variazione è principalmente dovuta a variazioni dell'espressione dei geni che codificano per i principali antigeni di superficie. I pazienti infettati mostrano ondate successive di parassitemia, ognuna delle quali è caratterizzata da parassiti che esprimono un antigene di superficie diverso da quello della precedente ondata. Ne consegue che l'arco di tempo necessario per instaurare una risposta anticorpale a un dato antigene è superiore alla velocità con cui il parassita muta il proprio profilo antigenico. Durante una singola infezione cronica possono verificarsi oltre 100 ondate di parassitemia. Un'evidente conseguenza della variazione antigenica nel parassita è l'estrema difficoltà a sviluppare un vaccino efficace contro queste infezioni.
- Durante la permanenza nell'ospite vertebrato, i parassiti diventano resistenti ai meccanismi immunitari effettori. Probabilmente il migliore esempio di tale fenomeno è rappresentato dalle larve di schistosoma, che nel corso della loro migrazione verso il polmone dell'ospite infetto, sviluppano un tegumento resistente all'attacco del complemento e dei CTL. Le basi biochimiche di questo cambiamento sono ancora sconosciute.
- I protozoi possono sottrarsi al sistema immunitario vivendo all'interno delle cellule ospiti o sviluppando cisti resistenti ai meccanismi effettori

dell’immunità. Alcuni elminti risiedono nel lume intestinale dove sono protetti dai meccanismi effettori dell’immunità cellulo-mediata. I parassiti possono anche rilasciare in forma solubile gli antigeni del loro tegumento, sia spontaneamente sia in seguito al legame di anticorpi specifici. Questi antigeni solubili fungono da esca per le cellule responsabili dei meccanismi effettori dell’immunità, distogliendole dalla loro azione nei confronti dei parassiti. *Entamoeba histolytica* è, per esempio, un protozoo che rilascia antigeni ma che è anche in grado di convertirsi in forma cistica nel lume dell’intestino crasso.

- I parassiti inibiscono la risposta immunitaria dell’ospite attraverso molteplici meccanismi. In alcune forme gravi di schistosomiasi che interessano il fegato e la milza e nelle infezioni da filaria è stato osservato uno stato di anergia T. I meccanismi responsabili di questo fenomeno non sono del tutto chiari; è possibile che nella filariasi linfatica l’infezione dei linfonodi, con la conseguente alterazione della loro struttura, possa contribuire al deficit immunitario. Alcuni parassiti, come *Leishmania*, inducono lo sviluppo di linfociti T regolatori $CD25^+$ che sopprimono le risposte immunitarie, così da permettere al parassita di persistere. Una immunosoppressione più generalizzata e aspecifica viene osservata in corso di malaria e tripanosomiasi africana. Questo tipo di alterazione sembra essere associato alla produzione di citochine immunosoppressive da parte dei macrofagi e dei linfociti T attivati, oltre che da alterazioni nella risposta T.

Le conseguenze delle infestazioni parassitarie per lo sviluppo sanitario ed economico dei Paesi in via di sviluppo sono devastanti. Da molti anni sono in corso tentativi per sviluppare vaccini efficaci contro queste patologie. Nonostante i progressi siano stati inferiori alle aspettative, la migliore comprensione dei meccanismi immunitari fondamentali e delle strategie attraverso cui i parassiti riescono a sfuggire alimenta le aspettative per un futuro successo.

STRATEGIE PER LO SVILUPPO DEI VACCINI

La nascita dell’immunologia come scienza risale al 1796, quando Edward Jenner sperimentò con successo la vaccinazione contro il vaiolo. L’importanza

dell'immunizzazione profilattica contro le malattie infettive è testimoniata dal successo dei programmi mondiali di vaccinazione, che hanno portato alla pressoché totale eradicazione di molte di queste malattie, almeno nei Paesi più sviluppati (vedi Tab. 1-1). Il principio fondamentale della vaccinazione è quello di somministrare una forma uccisa o attenuata di un agente infettivo o un componente di un microrganismo che non provochi la malattia, ma sia in grado di promuovere una risposta immunitaria che induca protezione nei confronti dell'infezione causata da un successivo contatto con il microrganismo patogeno.

Il successo dell'immunizzazione nell'eradicazione delle malattie infettive dipende dalle diverse proprietà dei microrganismi. I vaccini sono efficaci se il ciclo vitale dell'agente infettivo non include stadi di latenza, se l'agente stesso non va incontro a variazione antigenica e se non interferisce con la risposta immunitaria dell'ospite. In effetti, è difficile vaccinare efficacemente contro un virus come l'HIV che entra in latenza, è altamente variabile, e infetta i T linfociti $CD4^+$. I vaccini efficaci sono anche quelli per le infezioni specifiche per l'uomo e che non contemplano nel loro ciclo biologico reservoir animali.

Numerosi vaccini attualmente in uso inducono immunità umorale. Gli anticorpi rappresentano l'unico meccanismo immunologico in grado di prevenire le infezioni, neutralizzando ed eliminando i microrganismi prima che questi si insedino nell'ospite. I vaccini più efficaci sono quelli che stimolano lo sviluppo di plasmacellule a lunga sopravvivenza che producono anticorpi ad alta affinità e linfociti B della memoria. Questi aspetti della risposta umorale vengono attivati in modo ottimale nelle reazione del centro germinativo (vedi Cap. 12), che richiedono il supporto da parte dei linfociti T $CD4^+$.

Nei prossimi paragrafi riassumeremo i principali approcci vaccinali finora sperimentati (Tab. 16-6), discutendone i pregi e i limiti.

TABELLA 16-6 Approcci vaccinali

Tipo di vaccino	Esempi
Batteri vivi attenuati o uccisi	Bacillo di Calmette-Guérin, colera
Virus vivi attenuati	Poliomielite, rabbia
Vaccini a subunità (antigene) purificati	Tossoide tetanico, tossoide difterico
Vaccini coniugati	*Haemophilus influenzae*, pneumococco
Vaccini sintetici	Epatite (proteine ricombinanti)

Vettori virali	Sperimentazione clinica con antigeni dell’HIV nel vettore vaiolo del canarino (canarypox)
Vaccini a DNA	Studi clinici in corso per molte infezioni

Vaccini batterici e virali attenuati e inattivati

I vaccini composti da microrganismi intatti non patogenici vengono ottenuti trattando il microrganismo in modo da attenuarne la virulenza (ossia rendendolo incapace di causare la malattia) oppure uccidendolo senza alterarne l’immunogenicità. Il grande vantaggio dei vaccini batterici attenuati è la loro capacità di originare risposte immunitarie sia innate sia specifiche, simili a quelle che sarebbero evocate proprio dai microrganismi patogeni, rappresentando quindi la strategia ideale per indurre un’immunità protettiva. Louis Pasteur fu il primo a dimostrare la capacità dei batteri vivi attenuati di conferire immunità specifica. I vaccini con batteri attenuati o uccisi attualmente utilizzati inducono tuttavia una protezione limitata e sono efficaci solo per un limitato periodo di tempo. I vaccini costituiti da virus vivi o attenuati sono invece generalmente più efficaci; i vaccini contro la poliomielite, il morbillo e la febbre gialla sono tre esempi di questo tipo. L’approccio più frequentemente usato per produrre i virus attenuati è la loro coltura prolungata *in vitro*. Più recentemente, sono stati generati con lo stesso intento vaccini basati su ceppi virali mutati o sensibili alla temperatura per raggiungere lo stesso obiettivo. I vaccini virali spesso producono un’immunità specifica di lunga durata, tanto che la vaccinazione del bambino è sufficiente per una protezione che dura per tutta la vita. La principale preoccupazione quando si usano vaccini virali o batterici è la loro sicurezza. Il vaccino orale vivo attenuato antipolio ha quasi completamente eradicato la malattia ma in rari casi il virus presente nel vaccino viene riattivato e causa poliomielite paralitica. Il successo della vaccinazione contro la poliomelite a livello mondiale sta in realtà creando il problema che la malattia indotta dal vaccino, anche se estrememente rara, potrebbe diventare più frequente della malattia stessa. Questo potenziale problema potrebbe essere affrontato tornando al vaccino virale ucciso per completare il programma di eradicazione.

Un esempio di vaccino attenuato ampiamente utilizzato e molto importante per la salute pubblica è il vaccino contro l’influenza. Virus influenzali coltivati nelle uova di pollo sono usati in due tipologie di vaccini. Il più comune è il vaccino trivalente inattivato (ucciso) utilizzato nel cossiddetto vaccino

antinfluenzale, somministrato per via intramuscolare. In genere in questo vaccino vengono incorporati tre ceppi di virus influenzale scelti ogni anno tra i più frequentemente riscontrati. Un secondo tipo di vaccino antinfluenzale prevede l'uso degli stessi tre ceppi virali, ma contiene i virus attenuati vivi ed è assunto per via inalatoria (spray nasale).

Vaccini con antigeni purificati (a subunità antigeniche)

I vaccini a subunità sono costituiti da antigeni (o subunità antigeniche) purificati dal microrganismo o dalle sue tossine inattivate e sono generalmente somministrati in combinazione con un adiuvante. Questi vaccini sono assai efficaci nella prevenzione delle malattie provocate da tossine batteriche; le tossine infatti possono essere facilmente rese innocue senza alterarne l'immunogenicità, sì da ottenere i relativi "tossoidi" che soni usati per la vaccinazione e mantengono la capacità di indurre forti risposte anticorpali. La difterite e il tetano sono due infezioni potenzialmente fatali la cui incidenza è stata drasticamente diminuita grazie all'immunizzazione dei bambini con preparazioni di tossoidi. Vaccini costituiti da antigeni polisaccaridici batterici sono utilizzati contro gli pneumococchi e *Haemophilus influenzae*. Poiché i polisaccaridi sono antigeni T-indipendenti, tendono a stimolare una risposta anticorpale a bassa affinità e possono essere deboli immunogeni nei bambini (che non sono in grado di attivare una forte risposta immunitaria T-indipendente). Una risposta anticorpale ad alta affinità contro i polisaccaridi può comunque essere generata anche nei bambini coniugando i polisaccaridi ad antigeni proteici, formando i cosiddetti **vaccini coniugati**, che rappresentano un'eccellente applicazione pratica del principio di cooperazione tra linfociti T e B (vedi Cap. 12). I vaccini attualmente usati contro *H. influenzae*, pneumococchi e meningococchi sono proprio vaccini coniugati. I vaccini basati su proteine purificate stimolano i linfociti T helper e la risposta anticorpale, ma sono incapaci di generare una potente risposta CTL. Ciò avviene poiché le proteine esogene (o i peptidi) non vengono efficientemente processate e presentate in associazione a molecole MHC di classe I. Di conseguenza, i vaccini proteici non sono riconosciuti in modo efficiente dai linfociti T $CD8^+$ ristretti per classe I.

Vaccini con antigeni sintetici

Uno dei principali obiettivi della ricerca vaccinale è identificare gli antigeni o gli epitopi microbici dotati di maggiore immunogenicità e ottenerne in laboratorio forme sintetiche da utilizzare come vaccini. È oggi possibile dedurre la sequenza aminoacidica di un antigene proteico partendo dalla sua sequenza nucleotidica e produrre quindi grandi quantità di proteina attraverso la tecnologia del DNA ricombinante. Vaccini ottenuti con queste modalità sono attualmente in uso per il virus dell'epatite, per l'herpes simplex dell'afta epizootica (uno dei principali patogeni negli allevamenti di bestiame), del papillomavirus umano e dei rotavirus. Nel caso del vaccino contro il papilloma virus umano (*Human Papillomavirus Vaccine*, HPV) più utilizzato, che è stato sviluppato per prevenire i tumori indotti dal virus, le proteine virali ricombinanti ottenute da quattro ceppi virali (HPV 6, 11, 16 e 18) sono generate in cellule di lievito e associate a un adiuvante. Gli HPV 6 e HPV 11 sono causa comune di condilomi e gli HPV 16 e 18 sono associati al cancro della cervice uterina.

Vaccini virali vivi in forma ricombinante

Un altro approccio per lo sviluppo dei vaccini prevede di introdurre geni codificanti per antigeni microbici in virus non citopatici e di infettare poi i soggetti con i virus così modificati. In questo modo il virus produce direttamente l'antigene negli individui opportunamente infettati. Il grande vantaggio dei vettori virali è che essi, al pari dei virus patogeni, inducono una risposta immunitaria completa che include l'attivazione dei CTL. I virus prevalentemente utilizzati in questa metodica sono i vaccinia virus. L'inoculo di questo virus ricombinante induce in molte specie animali risposte sia umorali sia cellulo-mediate verso l'antigene prodotto dal gene esogeno (oltre che contro gli antigeni del vaccinia virus stesso). Un potenziale problema con i virus ricombinanti è che i virus possono infettare le cellule dell'ospite e, pur non essendo patogeni, possono produrre antigeni che stimolano una risposta CTL in grado di uccidere le cellule infettate. Questi e altri possibili problemi relativi alla loro sicurezza fanno sì che i vaccini a vettori virali ricombinanti siano ancora poco diffusi.

Vaccini a DNA

Un interessante tipo di vaccinazione è stato sviluppato sulla base di un'osservazione inattesa: l'inoculo di un plasmide contenente un cDNA

codificante per un antigene proteico determina una risposta immunitaria umorale e cellulare nei confronti dell'antigene stesso. È verosimile che alcune APC, come le DC, vengano transfettate dal plasmide e che il cDNA venga trascritto e tradotto nella cellula originando una proteina immunogena capace di indurre risposte specifiche. I plasmidi batterici sono ricchi di nucleotidi CpG non metilati e sono riconosciuti da un TLR (il TLR9) presente sulle DC e su altre cellule, inducendo quindi una risposta immunitaria innata che a sua volta stimola quella specifica (vedi Cap. 4). Pertanto, i vaccini a DNA plasmidico sono efficaci anche se somministrati in assenza di adiuvanti. La capacità di conservare i plasmidi senza bisogno di refrigerazione (potendo quindi utilizzarli nelle condizioni ambientali più variegate) rende questo tipo di vaccino estremamente promettente. Purtroppo, nei trial clinici i vaccini a DNA non si sono dimostrati particolarmente efficaci, anche a causa delle limitate conoscenze riguardo al loro funzionamento nell'uomo.

Adiuvanti e immunomodulatori

L'attivazione della risposta immunitaria contro gli antigeni proteici richiede l'attivazione dei linfociti T; per ottenere questo effetto è necessario che gli antigeni vengano somministrati in formulazioni che comprendano la presenza di adiuvanti. Gran parte degli adiuvanti stimola l'immunità innata mediante l'aumento dell'espressione delle molecole costimolatorie e la produzione di citochine come l'IL-12, che stimolano la proliferazione e la differenziazione dei linfociti T. I batteri uccisi dal calore sono potenti adiuvanti comunemente utilizzati nei modelli animali sperimentali, tuttavia la infiammazione locale, che può essere assai cospicua, scatenata da questi adiuvanti ne preclude l'impiego nell'uomo. Molti degli sforzi attuali sono concentrati sullo sviluppo di adiuvanti sicuri ed efficaci per l'uso umano. Solo due prodotti sono attualmente approvati per utilizzo clinico: il gel di idrossido di alluminio (ALUM) – che promuove in modo preferenziale le risposte dei linfociti B – e una formulazione lipidica chiamata squalene, che sembra meglio attivare i fagociti. Un'alternativa agli adiuvanti è costituita dalla somministrazione di sostanze che stimolano la risposta T; per esempio, è attualmente in sperimentazione clinica l'incorporazione dell'IL-12 nei vaccini poiché questa citochina favorisce lo sviluppo di una risposta immunitaria cellulo-mediata. Come già ricordato, il DNA plasmidico possiede un'attività adiuvante intrinseca ed è possibile incorporare in esso molecole costimolatorie (per

esempio B7, CD40) o citochine. Tutte queste idee, seppure interessanti, hanno per il momento valore esclusivamente sperimentale.

Immunizzazione passiva

L'immunità protettiva può essere conferita anche tramite l'immunizzazione passiva, per esempio mediante la somministrazione di anticorpi specifici. Nella pratica clinica, l'immunizzazione passiva è per lo più impiegata nel trattamento acuto di malattie potenzialmente fatali provocate da tossine, come quella tetanica, e per indurre protezione nei confronti di infezioni letali quali la rabbia e, almeno in alcuni casi, ebola. L'immunizzazione passiva può anche salvare la vita in individui morsi da serpenti velenosi. L'immunità passiva è di breve durata poiché l'ospite non risponde attivamente all'antigene e la protezione persiste solo fino a che è presente in circolo l'anticorpo somministrato. Infine, l'immunizzazione passiva non induce memoria immunologica, quindi l'individuo non è protetto nei confronti di successive esposizioni alla medesima tossina o al medesimo microrganismo.

RIEPILOGO

* L'interazione del sistema immunitario con gli agenti infettivi è un confronto dinamico tra i meccanismi dell'ospite, mirati a eliminare l'infezione, e le strategie del microrganismo, volte a consentirne la sopravvivenza a dispetto dei meccanismi di difesa. Diversi agenti infettivi stimolano differenti tipi di risposte immunitarie e hanno sviluppato meccanismi specializzati per eludere l'immunità. Infine, in alcune infezioni, la risposta immunitaria è essa stessa causa di danno tissutale e di malattia.
* L'immunità innata ai batteri extracellulari è esercitata dai fagociti e dal sistema del complemento (attraverso la via alternativa).
* La principale risposta immunitaria specifica verso i batteri extracellulari consiste nella produzione di anticorpi specifici che opsonizzano i batteri facilitandone la fagocitosi e che attivano il sistema del complemento. Le tossine prodotte da questi batteri sono neutralizzate da anticorpi specifici. Alcune tossine batteriche sono potenti induttori della produzione di citochine che possono causare patologie sistemiche associate a infezioni gravi e disseminate.
* L'immunità innata ai batteri intracellulari è dovuta principalmente ai macrofagi, tuttavia i batteri intracellulari sono in grado di sopravvivere e replicarsi all'interno delle cellule ospiti (tra le quali i fagociti) poiché hanno sviluppato dei meccanismi per resistere alla degradazione intracellulare.
* L'immunità specifica ai batteri intracellulari si esplica principalmente attraverso la risposta cellulo-mediata e consiste nell'attivazione dei macrofagi da parte dei linfociti T $CD4^+$ e nell'uccisione delle cellule infettate da parte dei CTL $CD8^+$. La più caratteristica manifestazione patologica delle infezioni da batteri intracellulari è l'infiammazione granulomatosa.

* La risposta protettiva verso i miceti consiste principalmente nell'immunità innata a carico dei neutrofili e macrofagi, e nell'immunità specifica cellulo-mediata. Negli individui immunocompetenti, le infezioni fungine vengono solitamente controllate dai fagociti e la loro disseminazione si osserva quasi esclusivamente nei soggetti immunodeficienti.
* L'immunità innata ai virus è dovuta agli IFN di tipo I e alle cellule NK. Gli anticorpi neutralizzanti impediscono l'ingresso dei virus nelle cellule nelle fasi precoci dell'infezione e successivamente quando il virus viene liberato dalle cellule infettate che vanno incontro a morte. Il principale meccanismo di difesa contro l'infezione conclamata è l'uccisione delle cellule infettate da parte dei CTL, i quali possono però causare un danno tissutale anche quando il virus non è di per sé dannoso. I virus sfuggono alla risposta immunitaria modificando i loro antigeni, inibendo la presentazione dell'antigene e producendo molecole immunosoppressive.
* I parassiti, come i protozoi e gli elminti, provocano infezioni croniche e persistenti, in quanto stimolano risposte innate assai deboli, questo perché, nel corso dell'evoluzione, i parassiti hanno sviluppato molteplici meccanismi per sfuggire e resistere all'immunità specifica. La diversità strutturale e antigenica dei parassiti si riflette nell'eterogeneità delle risposte specifiche da essi stimolate. I protozoi che vivono all'interno delle cellule dell'ospite sono eliminati dall'immunità cellulo-mediata, mentre gli elminti vengono eliminati dalle IgE e dai meccanismi microbicidi degli eosinofili e di altri leucociti. I parassiti sfuggono alle difese del sistema immunitario modificando i loro antigeni, acquisendo resistenza ai meccanismi effettori dell'immunità e mascherando e/o rilasciando i loro antigeni di superficie.
* La vaccinazione rappresenta una potente strategia per prevenire le infezioni. I vaccini più efficaci sono quelli che stimolano la produzione di anticorpi ad alta affinità e le cellule della memoria. Numerosi approcci vaccinali sono in uso clinico per la prevenzione di diverse infezioni.

LETTURE CONSIGLIATE

Principi generali

Alcais A.; Abel L.; Casanova J.-L: Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm. *Journal of Clinical Investigation* 119:2506–2514 (2009).

Dorhol A.; Kaufmann S.H: Fine-tuning T cell responses during infection. *Current Opinion in Immunology* 21:367–377 (2009).

Finlay B.B.; McFadden G: Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell* 124:767–782 (2006).

Immunità ai batteri extra- e intracellulari

Baxt L.A.; Garza-Mayers A.C.; Goldberg M.B: Bacterial subversion of host immune pathways. *Science* 340:697–701 (2013).

Brodsky I.E.; Medzhitov R: Targeting of immune signaling networks by bacterial pathogens. *Nature Cell Biology* 11:521–526 (2009).

Curtis M.M.; Way S.S: Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* 126:177–185 (2009).

O'Garra A.; Redford P.S.; McNab F.W.; et al.: The immune response in tuberculosis. A*nnual Review of Immunology* 31:475–527 (2013).

Immunità ai virus

Antoniou A.N.; Powis S.J: Pathogen evasion strategies for the major histocompatibility complex class I assembly pathway. *Immunology* 124:1–12 (2008).

Klenerman P.; Hill A: T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nature Immunology* 6:873–879 (2005).

Perry A.K.; Chen G.; Zheng D.; Tang H.; Cheng G: The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Research* 15:407–422 (2005).

Rouse B.T.; Seherwat S: Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? *Nature Reviews Immunology* 10:514–526 (2010).

Virgin H.W.; Wherry E.J.; Ahmed R: Redefining chronic viral infection. *Cell* 138:30–50 (2009).

Yan N.; Chen Z.J: Intrinsic antiviral immunity. *Nature Immunology* 13:214–222 (2012).

Immunità ai miceti

Romani L: Immunity to fungal infections. *Nature Reviews Immunology* 11:275–288 (2011).

Wuthrich M.; Deepe G.S.; Klein B: Adaptive immunity to fungi. *Annual Review of Immunology* 30:115–148 (2012).

Immunità ai parassiti

Good M.F.; Xu H.; Wykes M.; Engwerda C.R: Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annual Review of Immunology* 23:69–99 (2005).

Langhorne J.; Ndungu F.M.; Sponaas A.-M.; Marsh K: Immunity to malaria: more questions than answers. *Nature Immunology* 9:725–732 (2008).

Maizels R.M.; Pearce E.J.; Artis D.; Yazdanbaksh M.; Wynn T.A: Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. J*ournal of Experimental Medicine* 201:2059–2066 (2009).

McCulloch R: Antigenic variation in African trypanosomes: monitoring progress. *Trends in Parasitology* 20:117–121 (2004).

Vaccini e adiuvanti

Brunner R.; Jensen-Jarolim E.; Pali-Scholl I: The ABC of clinical and experimental adjuvants–a brief overview. I*mmunology Letters* 128:29–35 (2010).

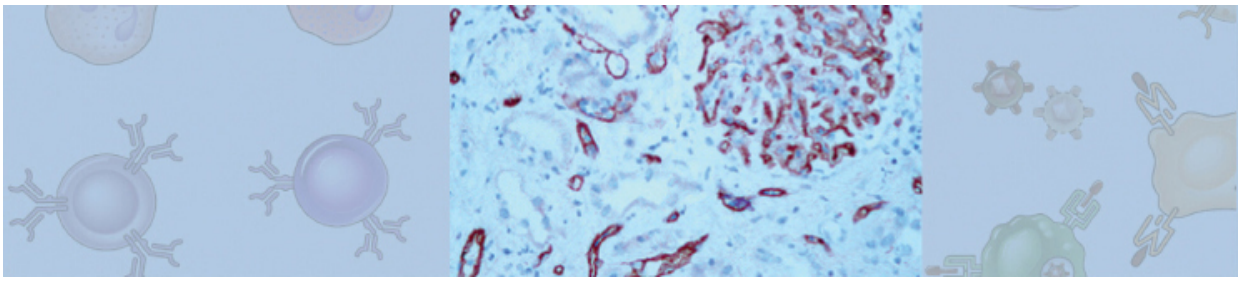
Donnelly J.J.; Wahren B.; Liu M.A: DNA vaccines: progress and challenges. *Journal of Immunology* 175:633–639 (2005).

Harris J.; Sharp F.A.; Lavelle E.C: The role of inflammasomes in the immunostimulatory effects of particulate vaccine adjuvants. *European Journal of Immunology* 40:634–638 (2010).

Koff W.C.; Burton D.R.; Johnson P.R.; et al.: Accelerating next-generation vaccine development for global disease prevention. *Science* 340:1232910 (2013).

CAPITOLO

17



Immunologia dei trapianti

PRINCIPI GENERALI DI IMMUNOLOGIA DEI TRAPIANTI

RISPOSTA IMMUNITARIA ADATTATIVA AL TRAPIANTO ALLOGENICO

- Natura degli alloantigeni
- Riconoscimento degli alloantigeni da parte dei linfociti T
- Attivazione e funzioni effettrici dei linfociti T alloreattivi
- Attivazione dei linfociti B alloreattivi e produzione e funzione degli alloanticorpi

VIE E MECCANISMI EFFETTORI DEL RIGETTO DELL'ALLOTRAPIANTO

- Rigetto iperacuto
- Rigetto acuto
- Rigetto cronico e vasculopatia del trapianto

PREVENZIONE E TRATTAMENTO DEL RIGETTO DELL'ALLOTRAPIANTO

- Metodi per ridurre l'immunogenicità dell'allotrapianto
- Immunosoppressione nella prevenzione o nel trattamento del rigetto dell'allotrapianto
- Metodi per indurre la tolleranza specifica al donatore

TRAPIANTO XENOGENICO

TRASFUSIONE DI SANGUE E ANTIGENI DEI GRUPPI SANGUIGNI AB0 E Rh

- Antigeni del gruppo sanguigno AB0
- Antigeni di altri gruppi sanguigni

TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE

- Reazione del trapianto contro l'ospite
- Immunodeficienza conseguente al trapianto di cellule staminali ematopoietiche

RIEPILOGO

Il trapianto è una strategia molto diffusa, utilizzata per sostituire organi e tessuti danneggiati con compromessa funzionalità. Tecnicamente è la procedura con cui si prelevano da un individuo cellule, tessuti oppure organi (detti essi stessi **trapianti**) e si trasferiscono a un soggetto, solitamente diverso. Il soggetto che fornisce il trapianto è detto **donatore** e quello che lo riceve è detto **ricevente,** o anche **ospite**. Se il trapianto è posizionato nella sua sede anatomica naturale, la procedura è chiamata *trapianto ortotopico*; se invece è posizionato in un sito anatomico differente, la procedura è chiamata *trapianto eterotopico*. Con il termine **trasfusione** si indica il trapianto di cellule ematiche circolanti o plasma da un individuo a un altro. L'utilizzo clinico dei trapianti è progressivamente aumentato negli ultimi 45

anni. Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche e di rene, fegato e cuore è oggi ampiamente diffuso e il trapianto di altri organi, come polmone e pancreas, sta diventando sempre più frequente (Fig. 17-1). Attualmente, negli Stati Uniti vengono eseguiti ogni anno più di 30.000 trapianti di rene, cuore, polmone, fegato. Inoltre, in anni recenti, è stata sperimentata la possibilità di trapiantare molti tipi di organi e cellule, incluse le cellule staminali tissutali.

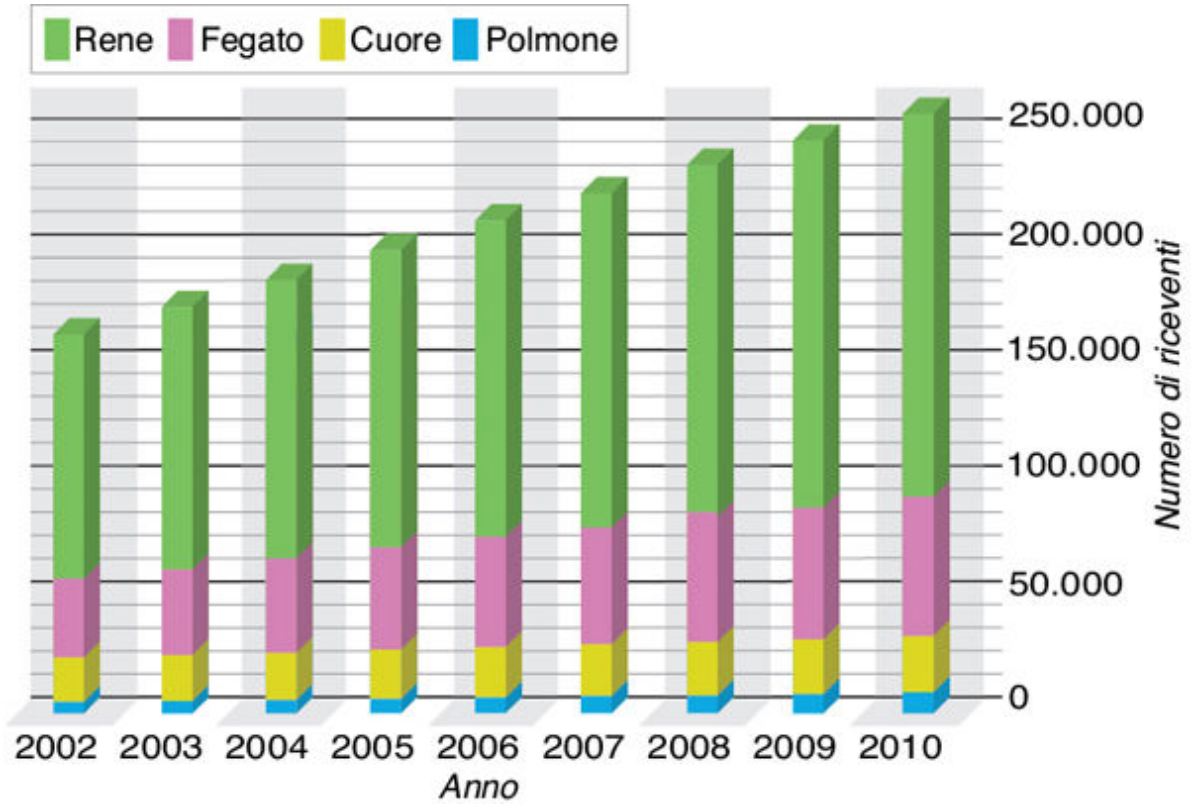


FIGURA 17-1 Numero di persone che vivono con un organo trapiantato funzionante, dati degli Stati Uniti, dal 1999 al 2007. (*Dati della relazione annuale 2012 dell'SRTR. Disponibili su http://www.srtr.org/. Consultati nell'aprile 2013.*)

Una volta superati i problemi tecnici correlati al trapianto chirurgico di organi, è risultato rapidamente evidente che la risposta immunitaria nei confronti dei tessuti trapiantati rappresentava il principale ostacolo a questa pratica. Il controllo di tale risposta è quindi la chiave per il successo di un trapianto. Questa consapevolezza ha portato allo sviluppo dell'immunologia dei trapianti quale disciplina settoriale nel più ampio comparto dell'immunologia, e l'immunologia dei trapianti costituisce l'oggetto di questo capitolo.

PRINCIPI GENERALI DI IMMUNOLOGIA DEI TRAPIANTI

Studi sperimentali e osservazioni cliniche hanno portato a codificare alcuni principi che si applicano solo all'immunologia dei trapianti e a nessun altro tipo di risposta immunitaria. Tali principi sono riassunti più avanti.

Il trapianto di cellule o tessuti da un individuo a un altro geneticamente diverso è sempre seguito da rigetto causato dall'immunità adattativa. Questo problema si presentò già durante i tentativi iniziali di sostituire, in pazienti ustionati, la cute lesa con quella di donatori occasionali, tentativi che si sono rivelati invariabilmente fallimentari. Nell'arco di 1-2 settimane, infatti, la cute trapiantata andava incontro a necrosi, con conseguente distacco e perdita dell'impianto cutaneo. Questi primi insuccessi spinsero Peter Medawar e altri ricercatori a studiare i trapianti cutanei in modelli animali. Questi esperimenti dimostrarono che l'insuccesso era causato da una reazione di tipo infiammatorio, definita come **rigetto**. La conclusione che il rigetto sia causato dall'immunità adattativa deriva da esperimenti che hanno dimostrato come questo processo sia caratterizzato da memoria e specificità e sia mediato da linfociti (Fig. 17-2). Infatti, il rigetto si manifesta nei 10-14 giorni successivi al primo trapianto da donatore a ricevente non compatibile (*rigetto di primo livello*), ma è più veloce nel caso di un secondo trapianto dallo stesso donatore allo stesso ricevente che abbia già *rigettato* il primo trapianto (*rigetto di secondo livello*). La rapida insorgenza del rigetto di secondo livello trova spiegazione nel fatto che il ricevente ha sviluppato memoria immunologica nei confronti del tessuto trapiantato. Gli individui che hanno rigettato un trapianto da un donatore rigettano più velocemente un successivo trapianto dallo stesso donatore ma non da un donatore diverso, dimostrando così che il rigetto è un processo immunologicamente specifico. Questi risultati sperimentali sono stati confermati dall'esperienza clinica. L'evidenza più convincente che il trapianto allogenico sia una risposta adattativa specifica viene dall'osservazione che si può riprodurre un rigetto di secondo livello in ospite seppure naïve, cioè in assenza di un primo trapianto, infondendo al contempo a quell'ospite linfociti già sensibilizzati verso il trapianto.

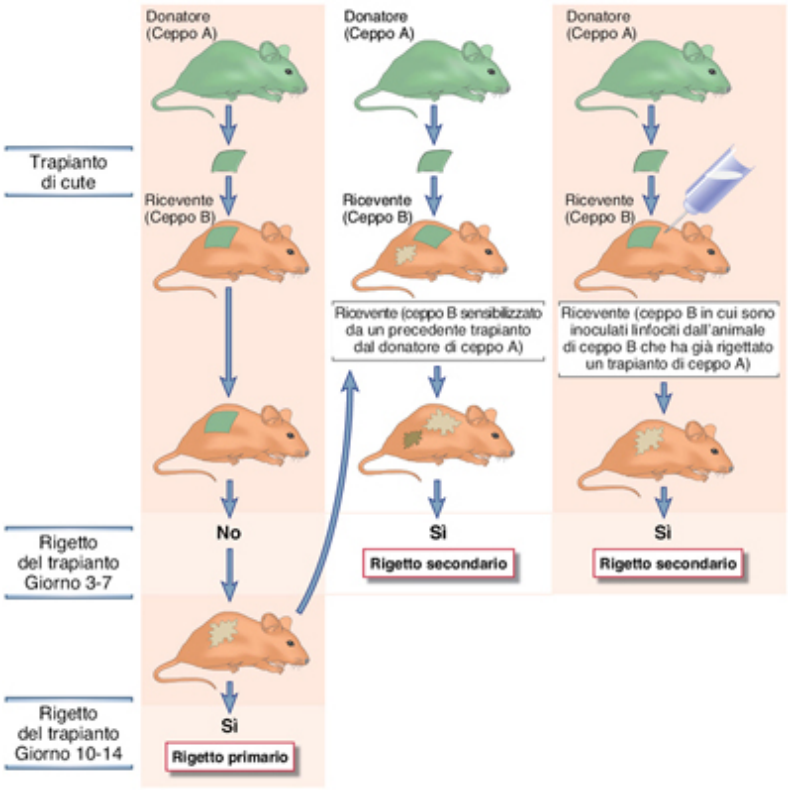


FIGURA 17-2 Rigetto primario e secondario dell'allotrapianto. Gli esperimenti mostrati indicano che il rigetto del trapianto presenta i tratti caratteristici dell'immunità specifica, cioè memoria e azione dei linfociti. Un topo inbred di ceppo B rigetterà un trapianto da un topo di ceppo A con una cinetica caratteristica della risposta primaria (*riquadro a sinistra*). Un topo inbred di ceppo B sensibilizzato da un precedente trapianto dal topo di ceppo A rigetterà un secondo trapianto da un topo di ceppo A con una cinetica caratteristica di una risposta secondaria (*riquadro centrale*), dimostrando il progressivo instaurarsi di memoria immunologica. Un topo inbred di ceppo B inoculato con linfociti da un altro topo di ceppo B che ha già rigettato un trapianto da un topo di ceppo A rigetterà un trapianto da topi di ceppo A con cinetiche di tipo secondario (*riquadro a destra*), dimostrando il ruolo dei linfociti nel mediare il rigetto e la memoria. Un topo inbred di ceppo B sensibilizzato da un precedente trapianto da un topo di ceppo A rigetterà un trapianto da un ceppo non correlato con una cinetica simile a una risposta primaria, quindi dimostrando un'altra caratteristica dell'immunità adattativa, la specificità (non mostrata in figura). I trapianti singenici non sono mai rigettati (non mostrata in figura).

L'immunologia dei trapianti fa uso di una specifica terminologia per descrivere i tipi di cellule e tessuti trapiantati. Un trapianto da un individuo allo stesso individuo è detto **trapianto autologo** (abbreviato con *autotrapianto*). Un trapianto tra due individui geneticamente identici è detto **trapianto singenico**. Un trapianto tra due individui geneticamente diversi ma appartenenti alla stessa specie è detto **trapianto allogenico** (o **allotrapianto**). Un trapianto tra individui appartenenti a specie diverse è detto **trapianto xenogenico** (o **xenotrapianto**). Le molecole riconosciute

come estranee nell'allotrapianto sono chiamate **alloantigeni**, mentre quelle degli xenotrapianti sono chiamate **xenoantigeni**. I linfociti e gli anticorpi che reagiscono contro gli alloantigeni e gli xenoantigeni vengono definiti rispettivamente **alloreattivi** e **xenoreattivi**.

La maggior parte di questo capitolo è dedicata al trapianto allogenico perché è più comune e meglio compreso rispetto a quello xenogenico, che sarà trattato solo brevemente al termine del capitolo. Saranno presi in esame sia i principi immunologici sia alcuni aspetti della pratica clinica. Il capitolo terminerà con un'analisi del trapianto di cellule staminali ematopoietiche allogeniche, che pone problematiche specifiche solitamente non riscontrate nei trapianti di organi solidi.

RISPOSTA IMMUNITARIA ADATTATIVA AL TRAPIANTO ALLOGENICO

Gli alloantigeni evocano una risposta immunitaria sia cellulo-mediata sia umorale. In questa parte del capitolo tratteremo i meccanismi cellulari e molecolari del riconoscimento di alloantigeni, caratterizzando la natura delle risposte allogeniche e le proprietà dei linfociti che rispondono ad alloantigeni.

Natura degli alloantigeni

Gli antigeni che stimolano le risposte immunitarie adattative nei confronti dei trapianti allogenici sono proteine di istocompatibilità, codificate da geni polimorfici che differiscono da un individuo all'altro. Come discusso nel Capitolo 6, tutti gli animali di un ceppo inbred sono geneticamente identici e sono omozigoti per tutti i geni (eccetto i cromosomi sessuali nel maschio). Gli animali inbred di ceppi diversi, invece, e gli individui (tranne i gemelli omozigoti) ereditano geni diversi, inclusi i geni di istocompatibilità. Le regole di base dell'immunologia, che sono state inizialmente stabilite utilizzando, per lo più, topi con patrimonio genetico ben definito, sono le seguenti (Fig. 17-3).

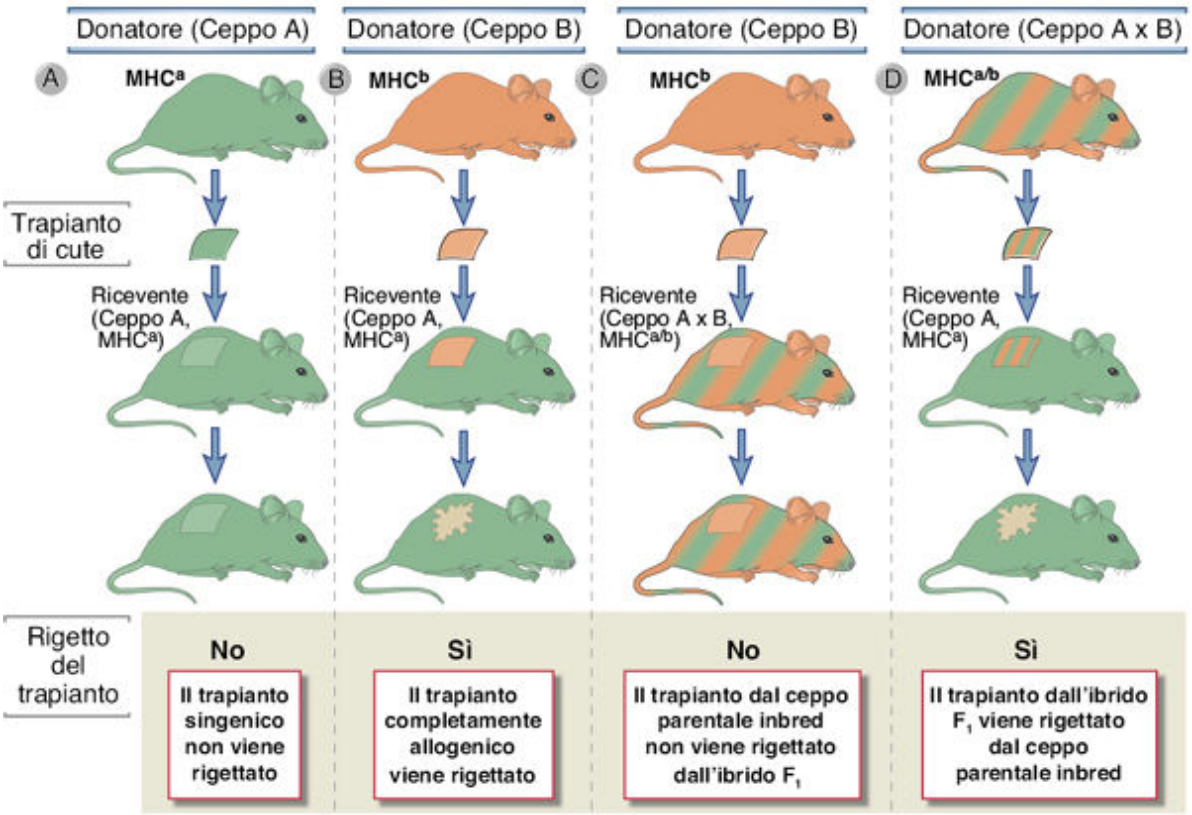


FIGURA 17-3 Genetica del rigetto del trapianto. Nella figura, i due topi di diverso colore rappresentano differenti aplotipi MHC. Gli alleli MHC ereditati da entrambi i genitori sono espressi in modo codominante nella cute di un discendente A × B; pertanto, questi topi sono rappresentati con i due colori. **A.** I trapianti singenici non vengono rigettati. **B.** Gli allotrapianti sono sempre rigettati. Il trapianto da un genitore di un ibrido A × B non sarà rigettato dalla prole (**C**), ma un trapianto dalla prole viene rigettato da entrambi i genitori (**D**). Questi fenomeni sono dovuti al fatto che i prodotti dei geni MHC sono responsabili del rigetto del trapianto. I trapianti sono rigettati solo se esprimono un tipo MHC (rappresentato dal colore *verde* o *arancione*) che non è espresso dal topo ricevente.

- Cellule od organi trapiantati tra individui geneticamente identici (gemelli identici, o individui dello stesso ceppo animale inbred) non vengono mai rigettati.
- Cellule od organi trapiantati tra individui geneticamente non identici o tra individui di due ceppi inbred diversi di una stessa specie sono sempre rigettati.
- La prole che deriva dall'incrocio tra due diversi ceppi animali inbred non rigetta i trapianti provenienti dai genitori. In altre parole, un animale $(A \times B)F_1$ non rigetterà tessuti trapiantati da un animale di ceppo A o B. (Questa regola non vale per il trapianto di midollo osseo, in cui le cellule NK di un ricevente $[A \times B]F_1$ rigettano le cellule di

midollo osseo di entrambi i genitori, come discusso altrove in questo capitolo.)

- Un trapianto che deriva dalla prole di un incrocio tra due diversi ceppi animali inbred sarà rigettato dai genitori. In altre parole, un trapianto da un animale $(A \times B)F_1$ sarà rigettato sia dall'animale di ceppo A sia da quello di ceppo B.

Questi risultati sperimentali suggeriscono che le molecole responsabili della reazione di rigetto siano polimorfe e che la loro espressione sia codominante. Il termine "**polimorfiche**" si riferisce al fatto che gli antigeni del trapianto differiscono da un individuo all'altro di una specie (eccetto i gemelli omozigoti) o tra animali di ceppi inbred diversi. Il termine "espressione codominante" significa che ogni individuo eredita geni codificanti per queste molecole da entrambi i genitori e che gli alleli di entrambi i genitori vengono espressi. Perciò un animale $(A \times B)F_1$ esprime gli alleli sia del ceppo A sia del ceppo B e riconosce come *self* sia i tessuti A sia B, mentre gli animali inbred A o B esprimono solo un allele e riconoscono come parzialmente estranei i tessuti $(A \times B)F_1$. Ecco perché un animale $(A \times B)F_1$ non rigetta trapianti di ceppo A o B, mentre i riceventi di ceppo A o B rigettano un trapianto $(A \times B)F_1$.

***Le molecole responsabili delle reazioni acute (rapide) di rigetto sono chiamate molecole del complesso maggiore di istocompatibilità* (Major Histocompatibility Complex, *MHC*).** George Snell e i suoi collaboratori hanno generato ceppi congenici di topi inbred per identificare i geni polimorfi che codificano per i bersagli molecolari del rigetto dell'allotrapianto. I ceppi congenici di topi inbred sono geneticamente identici, salvo differire per i soli geni di istocompatibilità coinvolti nel rigetto di trapianto, che sono dunque noti come geni del complesso MHC. I trapianti di tessuti tra due individui, eccetto i gemelli identici, sono sempre rigettati perché le molecole codificate da questi geni sono così polimorfe che non esistono individui che condividano lo stesso assetto di geni del complesso maggiore di istocompatibilità. Come abbiamo visto nel Capitolo 6, la normale funzione delle molecole MHC è quella di presentare i peptidi, derivati dagli antigeni proteici, in una forma che sia riconosciuta dai linfociti T. E tuttavia le molecole MHC fungono esse stesse da antigeni in un

trapianto non compatibile, in quanto i linfociti T ne riconoscono l'estraneità, come vedremo in seguito. Le molecole MHC umane sono note come *antigeni leucocitari umani* (*Human Leukocyte Antigens*, HLA) e i termini *MHC* e *HLA* sono usati in maniera intercambiabile nella specie umana.

In qualsiasi trapianto tra donatore e ricevente non geneticamente identici esistono ulteriori antigeni polimorfi, distinti dalle molecole MHC, contro i quali il ricevente può allestire una risposta immunitaria. Questi antigeni solitamente inducono reazioni di rigetto deboli o più lente (più graduali) rispetto alle molecole MHC e sono quindi chiamati **antigeni minori di istocompatibilità**. La maggior parte degli antigeni minori di istocompatibilità è costituita da proteine processate e presentate ai linfociti T dell'ospite in associazione a molecole MHC self espresse da cellule che presentano l'antigene (*Antigen-Presenting Cells*, APC) dell'ospite, in modo simile a quanto avviene per qualsiasi antigene proteico. La rilevanza degli antigeni minori di istocompatibilità nel trapianto clinico di organo è incerta, principalmente perché l'identificazione degli antigeni rilevanti ha avuto scarso successo. Nel topo, l'antigene H-Y del maschio sembra essere riconosciuto dal sistema immunitario di femmine riceventi trapianto da donatori maschi. Nell'uomo, il rischio di rigetto di trapianto di cuore è leggermente superiore se il donatore è di sesso maschile e il ricevente di sesso femminile, rispetto ai trapianti tra individui dello stesso sesso, ma, vista la scarsità di donatori di cuore, l'appaiamento per sesso non è molto pratico. Gli antigeni minori di istocompatibilità svolgono un ruolo più significativo nello stimolare le risposte trapianto-ospite nel caso di trapianto di cellule staminali ematopoietiche, come discusso più avanti, ma la natura degli antigeni rilevanti in questo contesto non è definita.

Riconoscimento degli alloantigeni da parte dei linfociti T

Le molecole MHC allogeniche di un trapianto possono essere presentate ai linfociti T del ricevente in due modi molto diversi, definiti come via diretta e indiretta (Fig. 17-4). I primi studi avevano mostrato che i linfociti T di un individuo che riceve il trapianto riconoscono le molecole MHC intatte, non processate, dell'organo trapiantato e questo fenomeno è chiamato **riconoscimento diretto degli alloantigeni**. Studi successivi hanno mostrato che a volte i linfociti T del ricevente riconoscono molecole MHC del

trapianto solo nel contesto delle molecole MHC del ricevente. Questo significa che cellule APC del ricevente presentano – tramite l'MHC, e ai linfociti di quest'ultimo – proteine processate dell'MHC allogenico e tale fenomeno è noto come **riconoscimento indiretto,** ed è sostanzialmente identico a quello del riconoscimento di qualsiasi antigene proteico, come per esempio le proteine microbiche. Non solo le molecole MHC ma anche gli antigeni minori di istocompatibilità possono essere presentati ai linfociti T dell'ospite tramite la via indiretta. Il riconoscimento, diretto o indiretto degli alloantigeni da parte dei linfociti T, è comunque l'evento che dà inizio a tutti i tipi di rigetto di trapianto allogenico. È probabile che, indipendentemente dalla via e dagli antigeni del trapianto che sono riconosciuti dai linfociti T dell'ospite, la risposta iniziale abbia luogo nei linfonodi che drenano il trapianto, come discuteremo più avanti. In questo caso, le APC devono essere in grado di migrare dal trapianto ai linfonodi.

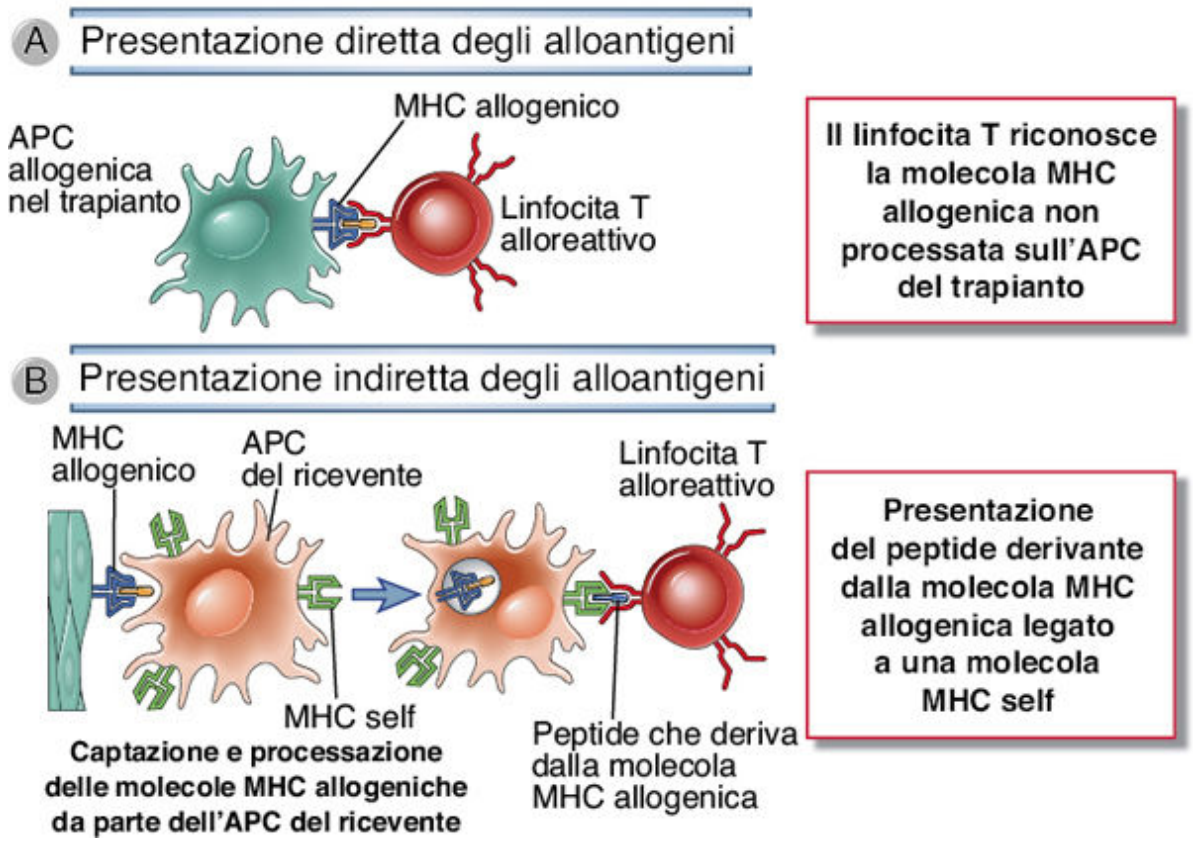


FIGURA 17-4 Riconoscimento diretto e indiretto degli alloantigeni. A. Il riconoscimento diretto dell'alloantigene si manifesta quando i linfociti T legano direttamente una molecola MHC allogenica espressa da una cellula che presenta l'antigene (APC) dell'organo trapiantato (donatore). **B.** Il riconoscimento indiretto dell'alloantigene avviene se le molecole MHC allogeniche espresse dalle cellule del trapianto sono captate e processate dalle APC del ricevente e i frammenti peptidici delle molecole MHC allogeniche contenenti residui aminoacidici polimorfi sono legati e presentati da molecole MHC del ricevente (self).

Riconoscimento diretto degli alloantigeni MHC espressi dalle cellule del donatore

Nel caso del riconoscimento diretto, le molecole MHC intatte presenti nelle cellule del trapianto sono riconosciute dai linfociti T del ricevente senza che debbano essere processate dalle APC dell'ospite (Fig. 17-5, *A*). È apparentemente sorprendente il fatto che i linfociti T, i quali durante la loro maturazione vengono selezionati per essere ristretti per l'MHC self, siano in grado di riconoscere molecole MHC estranee (allogeniche o xenogeniche). Una spiegazione probabile è che il recettore dei linfociti T (*T Cell Receptor*, TCR) sia dotato di una specificità intrinseca per le molecole MHC, indipendentemente dal fatto che siano self o non self. In altre parole, i geni del TCR si sarebbero evoluti per codificare una struttura del recettore con una qualche affinità intrinseca per le molecole MHC. Inoltre, durante lo sviluppo timico, la selezione positiva promuove la sopravvivenza dei linfociti T dotati di debole reattività nei confronti delle molecole MHC self, e tra queste potrebbero anche esserci cellule dotate di elevata affinità per molecole MHC allogeniche. Sebbene la selezione negativa elimini efficientemente i linfociti T con un'alta affinità per le molecole MHC self (vedi Capp. 8 e 15), non elimina necessariamente i linfociti T che hanno elevata affinità per molecole MHC allogeniche, semplicemente perché queste molecole non sono presenti nel timo. Ne consegue che il repertorio dei linfociti T maturi è caratterizzato da una bassa affinità intrinseca per le molecole MHC self e include molte cellule T che legano anche MHC allogenici con alta affinità. Si può quindi pensare all'alloriconoscimento diretto come a un esempio di reazione immunologica crociata in cui un linfocita T, selezionato per essere ristretto per MHC self, è in grado di legarsi a molecole MHC allogeniche strutturalmente simili con un'affinità sufficientemente alta da permetterne l'attivazione.

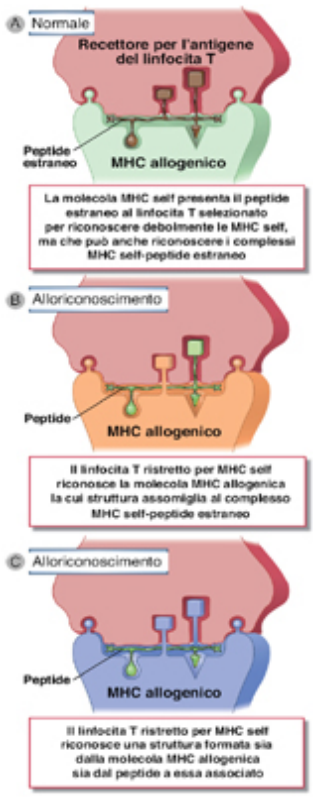


FIGURA 17-5 Basi molecolari del riconoscimento diretto delle molecole MHC allogeniche. Il riconoscimento diretto delle molecole MHC allogeniche può essere pensato come una cross-reattività in cui un linfocita T specifico per un complesso MHC self-peptide estraneo (**A**) riconosce anche una molecola MHC allogenica (**B**, **C**). I peptidi che si legano alle molecole MHC nel trapianto possono contribuire (**B**) o non contribuire (**C**) all'alloriconoscimento.

Normalmente, le molecole MHC espresse in membrana sono associate a un peptide e in alcuni casi il peptide contribuisce alla struttura che viene riconosciuta dai linfociti T alloreattivi, esattamente come succede nel normale riconoscimento degli antigeni non self da parte dei linfociti T ristretti per MHC self (Fig. 17-5, *B*). Anche se questi peptidi possono derivare da proteine presenti sia nel donatore sia nel ricevente, nelle cellule del trapianto questi pepetidi sono presentati da molecole MHC allogeniche. I complessi di peptidi (self e non self) e molecole MHC allogeniche sembreranno quindi diversi dai complessi formati da peptide self e MHC self. In altri casi, il riconoscimento diretto e l'attivazione di un linfocita T alloreattivo possono verificarsi indipendentemente dal tipo di peptide che viene presentato dalla molecola MHC allogenica, perché i residui aminoacidici polimorfi della molecola MHC allogenica formano da soli una struttura che assomiglia a un complesso MHC self più peptide (Fig. 17-5, *C*).

Le risposte dei linfociti T alle molecole MHC allogeniche presentate direttamente sono molto forti perché la frequenza dei linfociti T che possono riconoscere direttamente qualsiasi MHC allogenica singola è molto alta. Si stima che fino all'1-2% di tutti i linfociti T di un individuo possa riconoscere una molecola MHC allogenica su una cellula del donatore, un numero da 100 a 1.000 volte superiore alla frequenza dei linfociti T specifici per qualsiasi peptide microbico presentato dalle molecole MHC self. Vi sono diverse teorie per spiegare l'elevata frequenza di linfociti T che possono riconoscere direttamente MHC allogeniche.

- Molti peptidi derivati dalle proteine del donatore possono combinarsi con una singola molecola MHC allogenica e ciascuna di queste combinazioni peptide-MHC può teoricamente attivare un diverso clone di linfociti T del ricevente. Ciò avviene perché la nicchia legante il peptide delle molecole MHC può accogliere svariati peptidi e ciascun peptide in combinazione con la stessa molecola MHC appare diverso al TCR e si lega a diversi cloni di linfociti T.
- Ogni APC esprime migliaia di copie di molecole MHC diverse sulla sua superficie e, se si tratta di molecole MHC non self, molte di esse, o tutte, possono essere riconosciute da linfociti T alloreattivi. Invece, nel caso di un'infezione, meno dell'1% (o forse addirittura lo 0,1%) delle molecole MHC self su una APC presenta tutti i peptidi microbici allo stesso tempo e solo questi possono essere riconosciuti da linfociti T specifici per l'antigene microbico.
- Molti dei linfociti T che rispondono a una molecola MHC allogenica, anche alla prima esposizione, sono linfociti T della memoria. È probabile che questi linfociti della memoria siano stati generati durante una precedente esposizione ad altri antigeni (per esempio microbici) e interagiscano con molecole MHC allogeniche. Questi linfociti della memoria non sono solo popolazioni espanse di cellule specifiche per l'antigene ma rispondono anche più rapidamente e con maggiore potenza rispetto ai linfociti naïve e quindi contribuiscono alla maggiore forza della risposta dei linfociti T alloreattivi.

Il riconoscimento allogenico diretto può coinvolgere sia linfociti T $CD4^+$ sia i $CD8^+$ che, riconoscendo gli antigeni del trapianto, contribuiscono al

rigetto. Questo ruolo della risposta alloreattiva nel rigetto è descritto più avanti.

Riconoscimento indiretto degli alloantigeni

Nella via indiretta, le molecole MHC del donatore (allogeniche) sono catturate e processate dalle APC del ricevente e i peptidi derivati dalle molecole MHC allogeniche sono presentati in associazione con molecole MHC self (vedi Fig. 17-4, *B*). I peptidi che derivano dalle molecole MHC allogeniche sono presentati dalle APC del ricevente e sono riconosciute dai linfociti T come qualsiasi antigene proteico non self. Le molecole MHC allogeniche, che hanno sequenze aminoacidiche differenti da quelle del ricevente, possono dare origine a peptidi che, associati alle molecole MHC self del ricevente, vengono espressi sulla superficie delle APC del ricevente. In realtà le molecole MHC sono le proteine più polimorfe presenti nel genoma; perciò ogni molecola può dare origine a molteplici peptidi che l'ospite riconosce come non self, ciascuno riconosciuto da linfociti T diversi. La presentazione indiretta induce l'alloriconoscimento da parte dei linfociti T $CD4^+$ perché l'alloantigene è catturato e processato dalle APC dell'ospite nelle vescicole endosomiali (a seguito di fagocitosi) ed è quindi presentato da molecole MHC di classe II. È tuttavia possibile che alcuni antigeni delle cellule del trapianto, una volta fagocitati, entrino nella via di presentazione in classe I e vengano riconosciuti dai linfociti T $CD8^+$. Questo fenomeno è un esempio di cross-presentazione o cross-priming (vedi Fig. 6-20), in cui le cellule dendritiche catturano gli antigeni di una cellula del trapianto e presentano questi antigeni su molecole MHC di classe I per attivare o preattivare le cellule T $CD8^+$.

La dimostrazione che il riconoscimento indiretto di molecole MHC allogeniche è effettivamente coinvolto nel rigetto del trapianto viene da studi con topi knockout per molecole MHC di classe II. I trapianti di cute ottenuti da questi animali sono in grado di indurre la risposta dei linfociti T $CD4^+$ (cioè, ristretti per MHC di classe II) del ricevente in risposta ai peptidi derivati da molecole MHC di classe I. In questi esperimenti le molecole MHC di classe I del donatore sono processate e presentate dalle molecole di classe II sulle APC del ricevente e stimolano i linfociti T helper del ricevente. Ci sono indicazioni che anche nell'uomo la presentazione indiretta

contribuisce al rigetto tardivo degli allotrapianti. I linfociti T $CD4^+$ dei soggetti che hanno subito l'allotrapianto di cuore e fegato riconoscono e sono attivati dai peptidi che derivano dall'MHC del donatore presentati dalle APC dell'ospite.

Il contributo relativo della via diretta rispetto a quella indiretta nel meccanismo di alloriconoscimento nel rigetto di trapianto è tutt'ora oggetto di discussione. Si afferma spesso che il rigetto di trapianto acuto sia mediato principalmente dal riconoscimento diretto degli alloantigeni da parte dei linfociti $CD8^+$ che hanno un'azione immediata sul trapianto, mentre il rigetto cronico implichi un meccanismo a più componenti, che richiede l'attivazione dei linfociti $CD4^+$ che inducono il rigetto principalmente stimolando l'infiammazione mediata da citochine e inducendo i linfociti B a produrre anticorpi contro gli alloantigeni.

Attivazione e funzioni effettrici dei linfociti T alloreattivi

Quando i linfociti riconoscono gli alloantigeni, vengono attivati e possono proliferare, differenziarsi e svolgere funzioni effettrici che danneggiano il trapianto. Le fasi dell'attivazione sono simili a quelle descritte per i linfociti che reagiscono ad antigeni microbici.

Attivazione dei linfociti T alloreattivi

Le risposte dei linfociti T nei confronti di un organo trapiantato iniziano nei linfonodi drenanti (Fig. 17-6). La maggior parte degli organi contiene APC residenti, come cellule dendritiche, che, presenti nell'organo trapiantato, esprimono molecole MHC allogeniche del donatore, nonché molecole costimolatorie. Si ritiene che le APC del donatore migrino ai linfonodi regionali e qui presentino le molecole MHC allogeniche non processate ai linfociti T del ricevente (via diretta di alloriconoscimento). Inoltre, le cellule dendritiche del ricevente possono migrare, a loro volta, nel tessuto trapiantato, captare gli alloantigeni allogenici e trasportarli ai linfonodi drenanti, dove vengono presentati (via indiretta). Il collegamento tra i vasi linfatici degli allotrapianti e i linfonodi del ricevente non viene effettuato chirurgicamente ed è probabilmente reso possibile dalla comparsa di nuovi vie linfatiche che si generano in risposta agli stimoli infiammatori

associati al trapianto. I linfociti naïve che normalmente circolano nel linfonodo incontrano così questi alloantigeni e sono indotti a proliferare e a differenziarsi in cellule effettrici. Questo processo è chiamato anche **sensibilizzazione** agli alloantigeni. I linfociti T effettori raggiungono poi il trapianto e ne causano il rigetto.

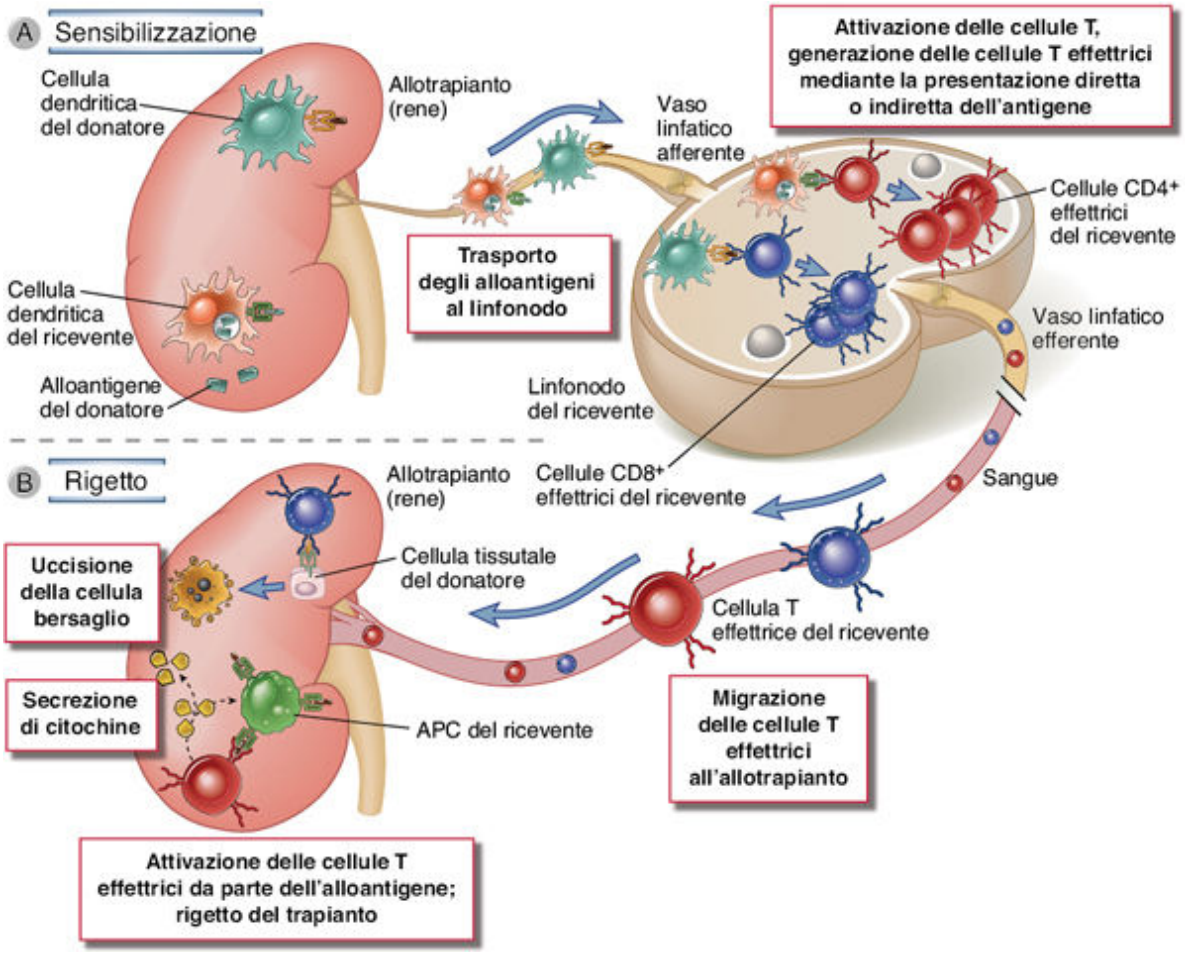


FIGURA 17-6 Attivazione dei linfociti T alloreattivi. A. Nel caso dell'alloriconoscimento diretto, le cellule dendritiche del donatore presenti nell'allotrapianto migrano ai tessuti linfoidi secondari, dove presentano le molecole MHC allogeniche ai linfociti T dell'ospite. Nel caso dell'alloriconoscimento indiretto, le cellule dendritiche del ricevente, che sono penetrate nell'allotrapianto, trasportano le proteine MHC del donatore ai tessuti linfoidi secondari e presentano i peptidi derivati da queste ai linfociti T alloreattivi del ricevente. In entrambi i casi i linfociti T si attivano e si differenziano in cellule effettrici. **B.** I linfociti T effettori alloreattivi migrano nel trapianto, vengono riattivate dagli alloantigeni e causano il danno.

Come discusso precedentemente, molti dei linfociti T che rispondono agli antigeni MHC allogenici, anche al primo riconoscimento, sono linfociti T della memoria cross-reattivi, prodotti in risposta ad antigeni ambientali

precedentemente al trapianto. A differenza dei linfociti T naïve, i linfociti T della memoria non devono necessariamente incontrare, nei linfonodi, gli antigeni presentati dalle cellule dendritiche per essere attivati e possono migrare direttamente nei trapianti dove sono attivati da APC residenti che presentano l'alloantigene.

Ruolo della costimolazione nella risposta delle cellule T agli alloantigeni

Oltre al riconoscimento degli alloantigeni, l'attivazione dei linfociti T alloreattivi richiede che i linfociti T siano appropriatamente costimolati da parte di molecole della famiglia B7 espresse dalle APC. Sia il rigetto del trapianto sia la stimolazione *in vitro* dei linfociti T alloreattivi possono essere inibiti da agenti che bloccano le molecole B7. Infatti, gli allotrapianti sopravvivono per periodi più lunghi in topi knockout per molecole B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) che non in riceventi immunologicamente intatti. Come vedremo più avanti, il blocco delle molecole B7 è utilizzato in clinica a scopo terapeutico per inibire il rigetto di trapianto.

La rilevanza delle molecole costimolatorie solleva l'importante problema del perché i meccanismi che causano l'espressione di queste molecole da parte delle APC del donatore agiscano anche in assenza di infezioni che, come abbiamo visto, rappresentano lo stimolo fisiologico per l'espressione delle molecole costimolatorie (vedi Cap. 9). L'espressione delle molecole costimolatorie potrebbe essere la conseguenza del danno da ischemia e della morte di alcune delle cellule dell'organo nel periodo che segue il prelievo fino al termine delle anastomosi vascolari. Alcune delle molecole espresse o rilasciate dalle cellule sottoposte al danno ischemico (i cosiddetti *pattern molecolari associati al danno cellulare*, discussi nel Capitolo 4) stimolano le risposte innate determinando l'aumento dell'espressione delle molecole costimolatorie da parte delle APC. In effetti l'esperienza clinica ha dimostrato che il tempo di ischemia è cruciale nel determinare la frequenza e la severità del rigetto di un organo. Una delle spiegazioni potrebbe dunque essere che la morte cellulare per ischemia favorisca l'avvio della reazione immunitaria verso il trapianto.

Reazione linfocitaria mista

La risposta dei linfociti T alloreattivi alle molecole MHC allogeniche può essere studiata *in vitro* mediante la **reazione linfocitaria mista** (*Mixed Lymphocyte Reaction*, MLR). L'MLR è un modello di riconoscimento diretto delle molecole MHC allogeniche da parte dei linfociti T; in passato è stata usata in clinica come test predittivo di rigetto del trapianto da parte di cellule T e come modello *in vitro* di rigetto di trapianto. Gli studi di MLR sono stati tra i primi a identificare il ruolo delle molecole MHC di classe I e di classe II nell'attivazione dei linfociti T ($CD8^+$ e $CD4^+$, rispettivamente).

L'MLR si osserva coltivando leucociti mononucleati (linfociti T e B, cellule *natural killer* [NK], fagociti mononucleati e cellule dendritiche) di un individuo con leucociti mononucleati di un altro soggetto. Nell'uomo si utilizzano cellule purificate dal sangue periferico; nel topo o nel ratto, i leucociti mononucleati sono invece in genere purificati dalla milza o dai linfonodi. Se i due individui hanno distinti MHC, un'ampia percentuale di linfociti di queste colture prolifererà nell'arco di 4-7 giorni. Questa risposta è denominata *MLR allogenica* (Fig. 17-7). Se le cellule di due individui che differiscono per il loro MHC sono, infatti, co-coltivate, queste possono reagire le une contro le altre e proliferare, dando origine a una MLR a due vie. Ai fini pratici, una delle due popolazioni leucocitarie può essere resa incapace di proliferare attraverso l'irradiazione con raggi γ o il trattamento con la mitomicina C, un farmaco antimitotico. In questo caso (MLR a una via), le cellule trattate hanno l'unico scopo di stimolare le cellule non trattate che mantengono la capacità di proliferare e costituiscono quindi le cellule responsive. Tra le cellule T che rispondono in una MLR, le cellule $CD4^+$ saranno specifiche per gli alloantigeni MHC di classe II, mentre quelle $CD8^+$ riconosceranno l'MHC di classe I.

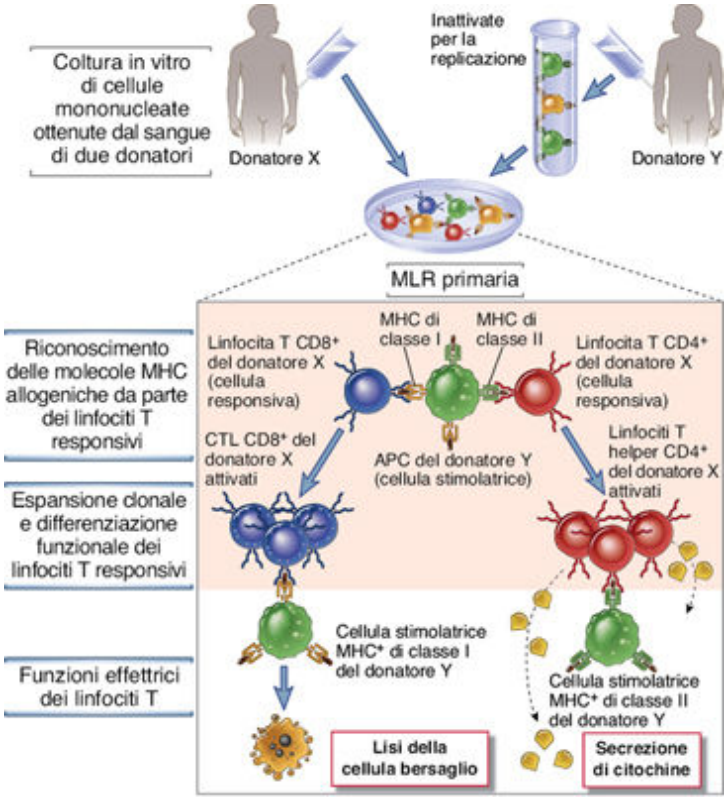


FIGURA 17-7 Reazione linfocitaria mista (*Mixed Lymphocyte Reaction*, MLR). In una MLR primaria a una via, le cellule stimolatrici (dal donatore Y) attivano e causano l'espansione di due tipi di linfociti T responsivi (dal donatore X). I linfociti T $CD4^+$ dal donatore X reagiscono alle molecole di classe II del donatore Y e i linfociti T $CD8^+$ del donatore X reagiscono alle molecole di classe I del donatore Y. I linfociti T $CD4^+$ si differenziano in cellule T helper in grado di secernere citochine e i linfociti T $CD8^+$ si differenziano in linfociti T citotossici (CTL). APC (*Antigen Presenting Cell*), cellula che presenta l'antigene.

A causa dell'elevata frequenza di linfociti T che possono riconoscere direttamente molecole MHC allogeniche, le risposte agli alloantigeni sono le sole risposte primarie dei linfociti T (ovvero, risposte a un antigene da parte di un individuo che non ha precedentemente incontrato l'antigene) che possono essere prontamente rilevate *in vitro*. Le risposte dei linfociti T a un antigene proteico non-MHC possono essere rilevate *in vitro* solo se i linfociti T provengono da un individuo che è stato precedentemente immunizzato con quell'antigene (per esempio mediante infezione o vaccinazione) perché i linfociti T naïve, e tuttavia dotati di specificità intrinseca per tale tipo di antigene, sono troppo pochi per dar luogo una risposta rilevabile *in vitro*.

Funzioni effettrici delle cellule T alloreattive

I linfociti T CD4$^+$ e CD8$^+$ attivati dagli alloantigeni causano il rigetto del trapianto attraverso due meccanismi distinti (vedi Fig. 17-6). Le cellule T helper CD4$^+$ differenziatesi in cellule effettrici producono citochine che danneggiano il trapianto, provocando un'infiammazione mediata da citochine, come nella reazione di ipersensensibilità ritardata (*Delayed-Type Hypersensitivity*, DTH) (vedi Capp. 10 e 19). Le cellule CD8$^+$ si differenziano in linfociti T citotossici (*Cytotoxic T Lymphocytes*, CTL) in grado di uccidere le cellule del trapianto che esprimono molecole MHC di classe I allogeniche. CTL secernono anche citochine, che contribuiscono al danno.

Solo CTL capaci di alloriconoscimento diretto possono uccidere direttamente le cellule del trapianto, mentre CTL o cellule T helper generate dal riconoscimento diretto o indiretto degli alloantigeni agiscono attraverso il rilascio di citochine citotossiche. CTL CD8$^+$ attivati dall'alloriconoscimento diretto delle molecole MHC del donatore su APC di quest'ultimo possono, infatti, riconoscere le stesse molecole MHC sulle cellule del parechima trapiantato e causarne morte. Invece, CTL CD8$^+$ attivati attraverso la via indiretta sono ristretti per MHC self e non sono in grado di uccidere cellule allogeniche, poiché queste cellule non esprimono alleli MHC self che presentino peptidi allogenici. Pertanto, quando i linfociti T alloreattivi sono stimolati per via indiretta, il meccanismo principale del rigetto non è l'uccisione da parte di CTL ma l'infiammazione provocata dalle citochine prodotte dalle cellule T effettrici. Probabilmente queste cellule effettrici infiltrano il tessuto trapiantato e riconoscono gli alloantigeni del trapianto presentati da APC dell'ospite, che hanno anch'esse infiltrato il trapianto.

Attivazione dei linfociti B alloreattivi e produzione e funzione degli alloanticorpi

Anche gli anticorpi specifici per gli antigeni del trapianto contribuiscono al rigetto. Molti degli alloanticorpi ad alta affinità sono prodotti da linfociti B alloreattivi attivati dai linfociti T helper, come normalmente avviene per la produzione di anticorpi contro altri antigeni proteici (vedi Cap. 12). Gli antigeni più frequentemente riconosciuti dagli alloanticorpi sono le molecole

HLA del donatore, incluse le proteine MHC di classe I e II. La sequenza di eventi più probabile per l'attivazione di cellule che producono alloanticorpi è: 1) riconoscimento di molecole MHC allogeniche da parte dei linfociti B naïve, 2) internalizzazione e processamento di queste proteine e 3) presentazione dei loro peptidi ai linfociti T helper già precedentemente attivati in seguito al riconoscimento degli stessi peptidi presentati da cellule dendritiche. Si tratta essenzialmente della stessa sequenza di eventi che si verifica nella risposta anticorpale sostenuta dai linfociti T helper (vedi Cap. 12). L'attivazione di linfociti B alloreattivi è quindi un esempio di presentazione indiretta di alloantigeni.

Gli anticorpi alloreattivi prodotti nel ricevente il trapianto utilizzano gli stessi meccanismi effettori che usano gli anticorpi per controllare le infezioni, inclusi attivazione del complemento, targeting e attivazione di neutrofili, macrofagi e cellule NK attraverso il legame con il recettore Fc. Poiché gli antigeni HLA sono espressi su cellule endoteliali, il danno mediato da alloanticorpi è principalmente diretto ai vasi del trapianto, come discusso nel paragrafo seguente.

VIE E MECCANISMI EFFETTORI DEL RIGETTO DELL'ALLOTRAPIANTO

Fin qui sono state descritte le basi molecolari del riconoscimento degli alloantigeni e le cellule coinvolte nel riconoscimento e nella risposta all'allotrapianto, mentre ora ci occuperemo dei meccanismi effettori responsabili del rigetto. In vari modelli animali e nella pratica clinica, il rigetto può essere dovuto ai linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$ alloreattivi e agli alloanticorpi. Questi diversi meccanismi effettori causano il rigetto del trapianto in modi diversificati e possono concorrere al rigetto.

Per motivi storici, il rigetto del trapianto è classificato in base alle sue caratteristiche istopatologiche in relazione al loro divenire, piuttosto che ai meccanismi responsabili. Usando il trapianto di rene come riferimento, il quadro istopatologico di rigetto può essere definito come *iperacuto*, *acuto* e *cronico* (Fig. 17-8). In ognuna di queste situazioni prevale un diverso

meccanismo effettore. Descriveremo questi meccanismi di rigetto illustrando gli effettori, che ne sono i mediatori finali.

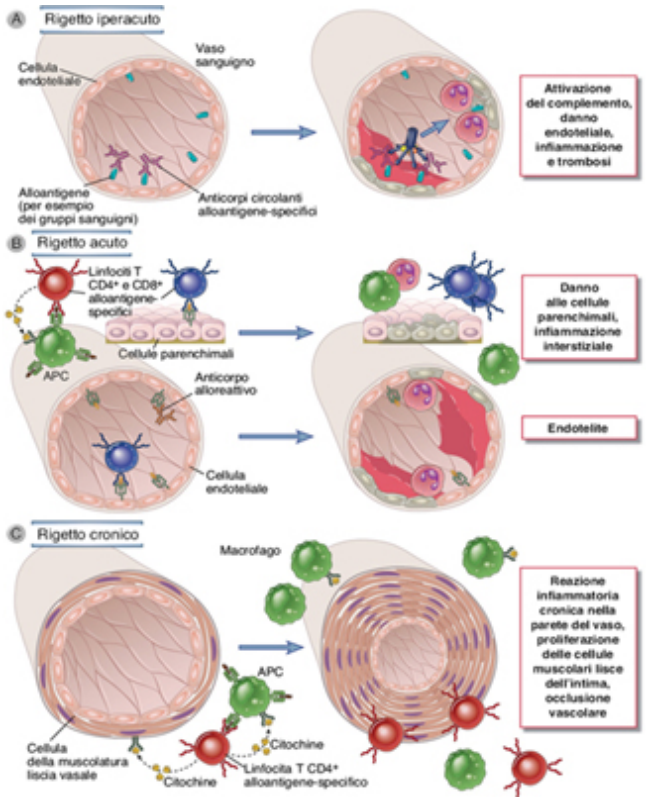


FIGURA 17-8 Meccanismi immunologici del rigetto di trapianto. A. Nel rigetto iperacuto, gli anticorpi preformati reattivi contro l'endotelio vascolare attivano il complemento e scatenano una rapida trombosi e la necrosi della parete vascolare. **B.** Nel rigetto acuto, i linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$ diretti contro gli alloantigeni presenti sulle cellule endoteliali e parenchimali mediano le lesioni di questi tipi cellulari. Anche gli anticorpi alloreattivi formatisi a seguito del trapianto contribuiscono al danno parenchimale e vascolare. **C.** Nel rigetto cronico con arteriosclerosi del trapianto, le lesioni delle pareti vasali portano alla proliferazione delle cellule muscolari lisce e all'occlusione del lume. Questa lesione può essere causata da una reazione infiammatoria cronica agli alloantigeni della parete vascolare.

Rigetto iperacuto

Il rigetto iperacuto è caratterizzato dall'occlusione trombotica dei vasi del trapianto, che inizia entro pochi minuti o poche ore dall'anastomosi dei vasi sanguigni del ricevente con i vasi del trapianto ed è mediata da anticorpi preesistenti nel circolo dell'ospite che riconoscono gli antigeni endoteliali del donatore (vedi Fig. 17-8, *A*). Il legame degli anticorpi all'endotelio del trapianto attiva il complemento, il quale, insieme agli

anticorpi, provoca una serie di alterazioni che promuovono la trombosi intravascolare. L'attivazione del complemento porta a un danno endoteliale e all'esposizione di proteine della membrana basale subendoteliale che attivano le piastrine. Le cellule endoteliali sono stimolate a secernere forme ad alto peso molecolare del fattore di von Willebrand, che mediano l'adesione e l'aggregazione piastrinica. Sia le cellule endoteliali sia le piastrine vanno incontro a vescicolazione della membrana, con conseguente liberazione di particelle lipidiche che favoriscono la coagulazione. Le cellule endoteliali perdono i proteoglicani eparan solfato di superficie che normalmente interagiscono con l'antitrombina III per inibire la coagulazione. Questi processi contribuiscono alla trombosi e all'occlusione vascolare (Fig. 17-9, *A*) e l'organo trapiantato va incontro a necrosi ischemica irreversibile.

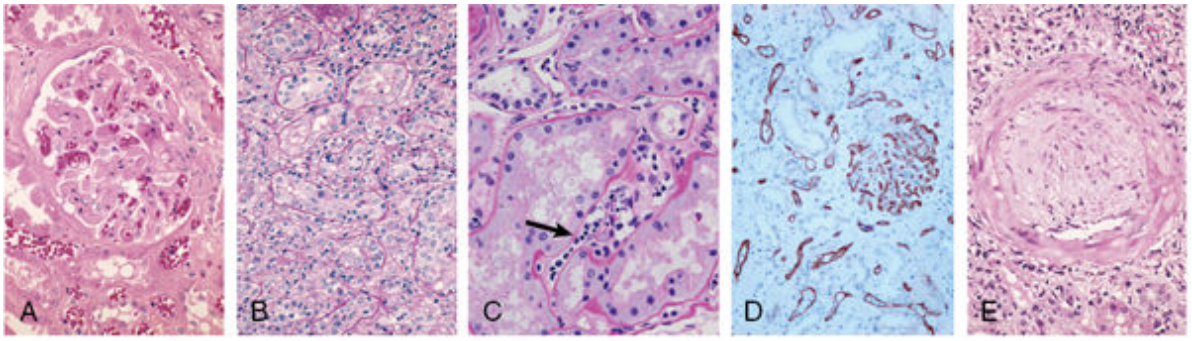


FIGURA 17-9 Quadro istopatologico delle diverse forme di rigetto. A. Rigetto iperacuto di allotrapianto renale con danno endoteliale, formazione di trombi costituiti da piastrine e trombina e infiltrazione precoce di neutrofili nel glomerulo. **B.** Rigetto acuto di trapianto renale con infiltrato infiammatorio nell'interstizio e tra le cellule epiteliali dei tubuli. **C.** Rigetto acuto mediato da anticorpi di un allotrapianto renale con cellule infiammatorie nei capillari.peritubulari (*freccia*). **D.** Deposizione del frammento del complemento C4d in vasi di un rigetto acuto mediato da anticorpi, rivelato mediante saggio immunoistochimico come colore marrone. **E.** Rigetto cronico di un allotrapianto renale con arteriosclerosi diffusa. Il lume vascolare è occupato da un accumulo di cellule muscolari lisce e di tessuto connettivo a livello dell'intima del vaso. (***A***, ***B*** *ed* ***E****, Per gentile concessione del Dr. Helmut Rennke, Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital.* ***C*** *e* ***D****, Per gentile concessione del Dr. Zoltan Laszik, Department of Pathology, University of California, San Francisco.*)

Nei primi giorni successivi al trapianto, il rigetto iperacuto è spesso mediato da alloanticorpi IgM, che sono presenti in alto titolo già prima del trapianto. Si ritiene che questi anticorpi naturali abbiano origine come risposta ad antigeni carboidratici espressi dai batteri che normalmente colonizzano l'intestino e che cross-reagiscono con vari alloantigeni. Come

vedremo in seguito in questo capitolo, i più noti esempi di questi alloanticorpi sono quelli diretti contro gli antigeni di gruppo sanguigno AB0 espressi dai globuli rossi. Gli antigeni AB0 sono anche espressi sulle cellule dell'endotelio vascolare. Oggi, il rigetto iperacuto da anticorpi anti-AB0 non rappresenta più un problema clinico poiché tutti i donatori e i riceventi sono selezionati in modo che esprimano gruppi sanguigni compatibili; tuttavia, come si vedrà, il rigetto iperacuto provocato dagli anticorpi naturali è il maggiore ostacolo allo xenotrapianto e limita l'uso di organi animali per i trapianti umani.

Attualmente, il rigetto iperacuto è solitamente mediato da anticorpi IgG diretti contro alloantigeni proteici, come le molecole MHC, oppure contro alloantigeni non ben definiti espressi dalle cellule dell'endotelio vascolare. Questi anticorpi sono in genere il risultato di una precedente esposizione ad alloantigeni attraverso trasfusioni di sangue, un precedente trapianto o gravidanze multiple. Se il livello di tali anticorpi è basso, il rigetto iperacuto può svilupparsi lentamente, nell'arco di giorni, e comunque l'esordio è sempre più precoce di quello che caratterizza il rigetto acuto. Come si vedrà più avanti, per evitare il rigetto iperacuto i pazienti sono routinariamente soggetti a screening prima del trapianto per evidenziare la possibile presenza di anticorpi che si legano a cellule di un potenziale donatore d'organo.

Nei rari casi in cui il trapianto debba essere fatto su un ricevente AB0 incompatibile, la sopravvivenza del trapianto può essere estesa eliminando il più possibile anticorpi e linfociti B. Se il trapianto non viene rigettato rapidamente, può sopravvivere anche in presenza di anticorpi antitrapianto. Un possibile meccanismo di resistenza al rigetto iperacuto è l'aumento dell'espressione di proteine che inibiscono il complemento da parte delle cellule endoteliali del trapianto, un adattamento del tessuto che è stato chiamato *accomodamento*.

Rigetto acuto

Il rigetto acuto è un processo di danno vascolare e parenchimale dovuto all'azione dei linfociti T alloreattivi e degli anticorpi. Prima dell'introduzione delle terapie immunosoppressive moderne, il rigetto acuto si manifestava nei giorni e nelle settimane immediatamente successivi al trapianto. La cinetica di comparsa di un rigetto acuto è legata al tempo

necessario per generare i linfociti T effettori alloreattivi e gli anticorpi in risposta al trapianto. Nella pratica clinica episodi di rigetto acuto si possono osservare anche in tempi distanti dal trapianto (anni) quando la terapia immunosoppressiva debba essere per qualche ragione interrotta. I meccanismi del rigetto acuto possono essere distinti in meccanismi cellulari (dovuti all'azione dei linfociti T) e umorali (dovuti all'azione degli anticorpi), ed entrambi coesistono in un organo che subisca rigetto acuto.

Rigetto acuto: meccanismi cellulari

I principali meccanismi cellulari responsabili del rigetto acuto sono l'infiammazione causata dalle citochine prodotte dai linfociti T helper e la morte indotta da CTL in cellule parenchimali ed endoteliali del trapianto (vedi Fig. 17-8, *B*). All'esame istologico degli allotrapianti di rene, in cui questo tipo di rigetto è meglio caratterizzato, risultano presenti infiltrati di linfociti e macrofagi (Fig. 17-9, *B*). Gli infiltrati possono coinvolgere i tubuli (tubulite), con necrosi tubulare associata, e i vasi sanguigni (endotelite), con necrosi delle pareti vascolari dei capillari e delle piccole arterie. Gli infiltrati cellulari presenti nei trapianti che subiscono rigetto cellulare acuto includono linfociti T helper $CD4^+$ e CTL $CD8^+$ specifici per gli alloantigeni del trapianto, ed entrambi questi tipi di linfociti T possono contribuire al danno a carico delle cellule parenchimali e dell'endotelio. I linfociti T helper includono cellule T_H1 secernenti IFN-γ e TNF, nonché cellule T_H17 secernenti IL-17, che contribuiscono entrambe all'attivazione dell'endotelio e dei macrofagi e al danno infiammatorio a carico dell'organo. Dal punto di vista sperimentale, il trasferimento dei linfociti T helper $CD4^+$ alloreattivi o dei CTL $CD8^+$ può causare il rigetto di tipo acuto nei topi riceventi.

Rigetto acuto: ruolo degli anticorpi

Gli alloanticorpi causano il rigetto acuto legandosi agli alloantigeni, soprattutto a molecole HLA, sulla superficie delle cellule dell'endotelio vascolare, provocando danno endoteliale e trombosi intravascolare che porta alla distruzione del trapianto (Fig. 17-8, *B*). Il legame degli alloanticorpi alla superficie delle cellule endoteliali induce l'attivazione locale del complemento, che determina la lisi cellulare, il reclutamento e

l’attivazione dei neutrofili e la formazione del trombo. Gli alloanticorpi possono anche legare recettori Fc sui neutrofili e su cellule NK, che causano così morte endoteliale. Inoltre, il legame degli alloanticorpi può direttamente alterare le funzioni endoteliali, attivando segnali intracellulari che producono l’aumento dell’espressione di molecole proinfiammatorie e procoagulanti.

La caratteristica istologica del rigetto acuto mediato da anticorpi in caso di allotrapianto di rene è l’infiammazione acuta dei glomeruli e dei capillari peritubulari con trombosi focale dei capillari (Fig. 17-9, *C*). Nel trapianto di rene, l’identificazione immunoistochimica del frammento C4d del complemento nei capillari del trapiantato viene utilizzata come indicatore dell’attivazione della via classica del complemento e di rigetto dovuto a meccanismi umorali (Fig. 17-9, *D*). In una percentuale significativa di casi di rigetto mediato da anticorpi, non è tuttavia possibile riscontrare depositi di frammento C4d. Questa osservazione suggerisce che in questi casi il danno sia causato dal legame degli alloanticorpi alle cellule endoteliali indipendentemente dall’azione del complemento, come già visto sopra.

Rigetto cronico e vasculopatia del trapianto

Con il miglioramento della terapia per il rigetto acuto, il rigetto cronico è diventato la causa principale del malfunzionamento degli organi trapiantati vascolarizzati. A partire dall’anno 1999, la sopravvivenza a 1 anno dell’allotrapianto di rene ha superato il 90%, ma la sopravvivenza a 10 anni è rimasta al 60%, questo nonostante i progressi della terapia immunosoppressiva. Il rigetto cronico si sviluppa dopo mesi o anni asintomatici e può essere preceduto da episodi clinicamente evidenti di rigetto acuto. Il rigetto cronico è associato ad alterazioni patologiche specifiche dell’organo coinvolto. Per esempio, nel rene e nel cuore causa occlusione vascolare e fibrosi interstiziale. Il trapianto polmonare mostra un ispessimento delle piccole vie aeree (*bronchiolite obliterante*), mentre il trapianto di fegato mostra i dotti biliari fibrotici e non funzionali.

La principale lesione che caratterizza il rigetto cronico degli organi vascolarizzati è l’occlusione delle arterie, una conseguenza della proliferazione delle cellule muscolari lisce dell’intima. Questo determina la perdita di funzionalità del trapianto soprattutto a causa del conseguente danno ischemico (vedi Fig. 17-8, *C*). Queste modificazioni delle arterie

sono chiamate *vasculopatia del trapianto* o *arteriosclerosi accelerata* (vedi Fig. 17-9, *E*). La vasculopatia è un fenomeno che si sviluppa frequentemente nel trapianto di cuore e di rene, ma può manifestarsi in qualunque organo vascolarizzato nei 6-12 mesi successivi al trapianto. I meccanismi più probabili alla base delle lesioni vascolari occlusive del rigetto cronico sono: l'attivazione dei linfociti T alloreattivi e la produzione di citochine in grado di stimolare la proliferazione della muscolatura liscia vasale. Con il progredire delle lesioni arteriose dovute al processo di arteriosclerosi del trapianto, l'apporto di sangue all'organo viene ridotto e il parenchima viene progressivamente sostituito da tessuto fibroso non funzionale. La fibrosi interstiziale osservata nel rigetto cronico può anche rappresentare una risposta di riparazione al danno subito dal parenchima a seguito di rigetto acuto mediato sia da linfociti sia da anticorpi, ischemia perioperatoria, effetti tossici dei farmaci immunosoppressivi e persino infezioni virali croniche. Il rigetto cronico porta a scompenso cardiaco e aritmie nei pazienti con trapianto di cuore e a perdita della funzionalità tubulare e insufficienza renale nei pazienti con trapianto di rene.

PREVENZIONE E TRATTAMENTO DEL RIGETTO DELL'ALLOTRAPIANTO

Se il ricevente di un allotrapianto ha un sistema immunitario perfettamente funzionante, il trapianto va incontro quasi inevitabilmente a qualche forma di rigetto. Le strategie usate nella pratica clinica e nei modelli sperimentali per evitare o ritardare il rigetto mirano a instaurare un'immunosoppressione generalizzata per ridurre al minimo gli effetti dell'alloreattività specifica. Uno degli obiettivi principali della ricerca sui trapianti è trovare il modo di indurre uno stato di tolleranza specifica, che permetterebbe al trapianto di sopravvivere senza la necessità di ricorrere a un'immunosoppressione generalizzata (aspecifica).

Metodi per ridurre l'immunogenicità dell'allotrapianto

Nel trapianto su esseri umani, la principale strategia per ridurre l'immunogenicità del trapianto consisteva nel ridurre le differenze

genetiche tra il donatore e il ricevente. Diversi test di laboratorio vengono abitualmente condotti per ridurre il rischio di rigetto immunologico degli allotrapianti e includono la tipizzazione AB0, la determinazione degli alleli di HLA espressi sulle cellule del donatore e del ricevente, nota come tipizzazione tissutale, l'identificazione nel ricevente di anticorpi preformati che riconoscano antigeni HLA e altri antigeni espressi dal donatore e, altresì, la ricerca nel ricevente di anticorpi preformati che riconoscano antigeni leucocitari di un potenziale donatore, secondo una metodologia nota come cross-matching. Non tutti questi test vengono effettuati in tutti i tipi di trapianto. Riassumeremo ora ciascuno di questi test e ne discuteremo il significato.

Per evitare il rigetto iperacuto, gli antigeni del gruppo sanguigno del donatore vengono selezionati in modo da essere compatibili con quelli del ricevente. Questo test viene usato abitualmente nel trapianto di rene e di cuore perché tali trapianti solitamente non sopravvivono se vi sono incompatibilità tra il gruppo sanguigno del donatore e del ricevente. Gli anticorpi IgM naturali specifici per gli antigeni allogenici del gruppo sanguigno causano rigetto iperacuto. La tipizzazione del gruppo sanguigno viene effettuata aggiungendo gli eritrociti di un paziente a sieri standardizzati contenenti anticorpi anti-A o anti-B. Se il paziente esprime uno degli antigeni del gruppo sanguigno, il siero specifico per quell'antigene causa l'agglutinazione degli eritrociti. La biologia del sistema dei gruppi sanguigni è discussa più avanti in questo capitolo nel contesto delle trasfusioni di sangue.

Nel trapianto renale, maggiore è il numero di alleli MHC condivisi dal donatore e dal ricevente, migliore sarà la sopravvivenza del trapianto (Fig. 17-10). La condivisione allelica HLA aveva un'influenza più marcata sulla sopravvivenza dei trapianti prima che fossero usati di routine i moderni farmaci immunosoppressivi, ma i dati attuali mostrano ancora una sopravvivenza significativamente superiore dei trapianti in cui donatore e ricevente hanno meno *mismatch* tra alleli HLA. L'esperienza clinica del passato, basata su metodi di tipizzazione più vecchi, ha dimostrato che il *match/mismatch* di tutti i loci MHC di classe I e di classe II per HLA-A, HLA-B e HLA-DR è particolarmente importante per prevedere la sopravvivenza degli allotrapianti di rene (HLA-C non è polimorfo quanto HLA-A o HLA-B, mentre HLA-DR e HLA-DQ sono soggetti a *linkage*

disequilibrium [squilibrio da associazione gametica; determinato dalla vicinanza tra i loci e dalla loro tendenza a essere trasmessi in blocco; *N.d.T.*], per cui una coincidenza di locus DR spesso si riflette anche in una coincidenza di DQ). Anche se gli attuali protocolli in molti centri includono la tipizzazione dei loci HLA-C, DQ e DP, la maggior parte dei dati disponibili per prevedere l'esito dei trapianti riguarda il *mismatch* di HLA-A, HLA-B e HLA-DR. Poiché vengono ereditati due alleli espressi in modo codominante da ognuno di questi geni HLA, è possibile che vi siano da zero a sei *mismatch* di HLA per questi tre loci tra il donatore e il ricevente. Se si verifica *mismatch* per zero antigeni, la sopravvivenza dei trapianti da donatore vivente consanguineo sarà massima, mentre i trapianti con *mismatch* per un antigene hanno una sopravvivenza leggermente inferiore. La sopravvivenza dei trapianti con un numero compreso tra due e sei *mismatch* HLA è significativamente peggiore di quella dei trapianti con *mismatch* per zero o un antigene. Il *mismatch* di due o più geni HLA ha un impatto ancora superiore sugli allotrapianti di rene da donatore non vivente (non consanguineo). Si tenta quindi di ridurre il numero di differenze negli alleli HLA espressi sulle cellule del donatore e del ricevente, con un effetto modesto sulla riduzione delle possibilità di rigetto.

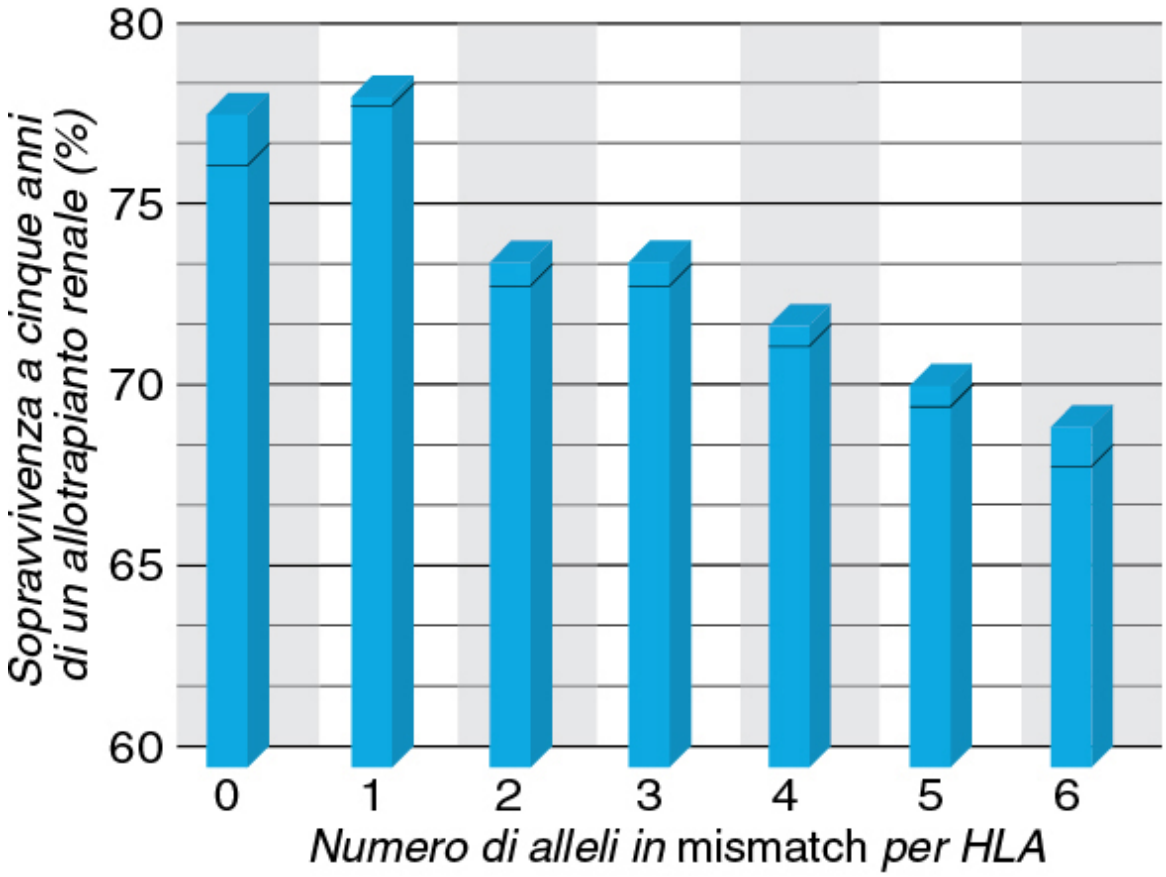


FIGURA 17-10 Effetto della compatibilità per MHC sulla sopravvivenza del trapianto. La condivisione di alleli MHC tra donatore e ricevente migliora la sopravvivenza del trapianto. I dati sono relativi a trapianti da cadavere. La compatibilità per MHC ha un effetto meno marcato in caso di trapianto da donatore vivo. Alcuni tra gli alleli MHC hanno una maggiore rilevanza ai fini della sopravvivenza del trapianto. (*Dati della relazione annuale 2012 dell'SRTR. Disponibili su http://www.srtr.org/. Consultati nel luglio 2013.*)

La ricerca della compatibilità per HLA nel trapianto renale è possibile perché i reni del donatore possono essere conservati fino a 72 ore prima di essere trapiantati e i pazienti che necessitano di allotrapianto di rene possono essere mantenuti in dialisi finché non è disponibile un organo che presenti una buona compatibilità. Nel caso di trapianti di cuore e di fegato, la conservazione dell'organo è più difficoltosa e i riceventi potenziali sono spesso in condizioni critiche. Per questo motivo, la tipizzazione dell'HLA non viene presa in considerazione quando si abbinano donatori potenziali e riceventi, e la scelta del donatore e del ricevente si basa sulla compatibilità dei gruppi sanguigni, su altre misure di compatibilità immunologica descritte più avanti e sulla compatibilità anatomica. La scarsità di donatori di cuore, la necessità sempre maggiore di trapianti e il successo

dell'immunosoppressione prevalgono sul possibile beneficio derivante dal ridurre il *mismatch* per HLA tra donatore e ricevente. Come discuteremo più avanti, nel trapianto di midollo osseo la compatibilità per HLA è essenziale per ridurre il rischio di reazione di trapianto-contro-ospite.

L'analisi dell'aplotipo HLA viene oggi principalmente effettuata mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*), che ha sostituito metodi sierologici più vecchi. I geni MHC possono essere amplificati mediante PCR con l'uso di *primer* che si legano a sequenze non polimorfe delle estremità 5' e 3' degli esoni che codificano per le regioni polimorfe delle molecole MHC di classe I e di classe II. Il segmento amplificato di DNA può quindi essere sequenziato. La reale sequenza nucleotidica, quindi, e la sequenza aminoacidica dedotta, possono essere direttamente determinate per gli alleli MHC di qualsiasi cellula, fornendo una tipizzazione molecolare univoca. Sulla base di questi test di sequenziamento del DNA, la nomenclatura degli alleli HLA è cambiata in seguito all'identificazione di molti alleli non riconosciuti con i precedenti metodi sierologici. Ogni allele definito da una sequenza ha un numero ad almeno quattro cifre ma alcuni alleli necessitano di sei o otto cifre per una definizione precisa. Le prime due cifre solitamente corrispondono al vecchio allotipo definito sierologicamente mentre la terza e quarta cifra indicano i sottotipi. Gli alleli che differiscono nelle prime quattro cifre codificano per proteine con aminoacidi diversi. Per esempio, HLA-DRB*1301 è l'allele 01 nella famiglia definita sierologicamente di geni HLA-DR13 che codifica per HLA-DR β1 (la forma prevalente di subunità β nell'HLA-DR; *N.d.T.*).

Nei pazienti che necessitano di allotrapianti viene anche studiata la presenza di anticorpi preformati contro molecole MHC del donatore o altri antigeni di superficie. Per identificare questi anticorpi vengono eseguiti due tipi di test. Utilizzando un pannello di molecole HLA, i pazienti in attesa di trapianto d'organo vengono sottoposti a screening per la presenza di anticorpi reattivi preformati con molecole HLA allogeniche prevalenti nella popolazione. Questi anticorpi, che possono essere stati prodotti in seguito a precedenti gravidanze, trasfusioni o trapianti, possono stimare il rischio di rigetto vascolare iperacuto o acuto. Piccole quantità di siero del paziente vengono miscelate con diverse sfere rivestite di un fluorocromo in associazione con molecole MHC definite, che rappresentano gli alleli MHC che possono essere presenti in una popolazione di donatori d'organo. Ogni

allele MHC viene adeso a una sfera con un fluorocromo di diverso colore. Il legame degli anticorpi del paziente alle sfere viene rivelato mediante citometria a flusso. I risultati sono riportati come percentuale di anticorpi reattivi (PRA), che rappresenta la percentuale del pool allelico MHC con la quale reagisce il siero del paziente. Il PRA viene determinato in varie volte durante l'attesa di un trapianto d'organo perché può cambiare, essendo ogni pannello scelto a caso e poiché i titoli anticorpali del siero del paziente possono, anch'essi, cambiare nel tempo.

Se viene identificato un potenziale donatore, il test di cross-matching determinerà se il paziente presenta anticorpi che reagiscono in modo specifico con le cellule di quel donatore. Il test viene effettuato miscelando il siero del ricevente con i linfociti del sangue del donatore. Possono quindi essere usati test di citotossicità mediata dal complemento o citometria a flusso per determinare se gli anticorpi nel siero del ricevente si sono legati alle cellule del donatore. Per esempio, viene aggiunto il complemento alla miscela di cellule e siero e, se nel siero del ricevente sono presenti anticorpi preformati, solitamente contro le molecole MHC del donatore, le cellule del donatore vengono lisate. Si tratta in questo caso di un cross-match positivo, che indica che il donatore non è adatto a quel ricevente.

Immunosoppressione nella prevenzione o nel trattamento del rigetto dell'allotrapianto

I farmaci immunosoppressori che inibiscono o uccidono i linfociti T rappresentano il principale regime terapeutico nel rigetto del trapianto. Vengono comunemente utilizzati numerosi metodi di immunosoppressione (Fig. 17-11).

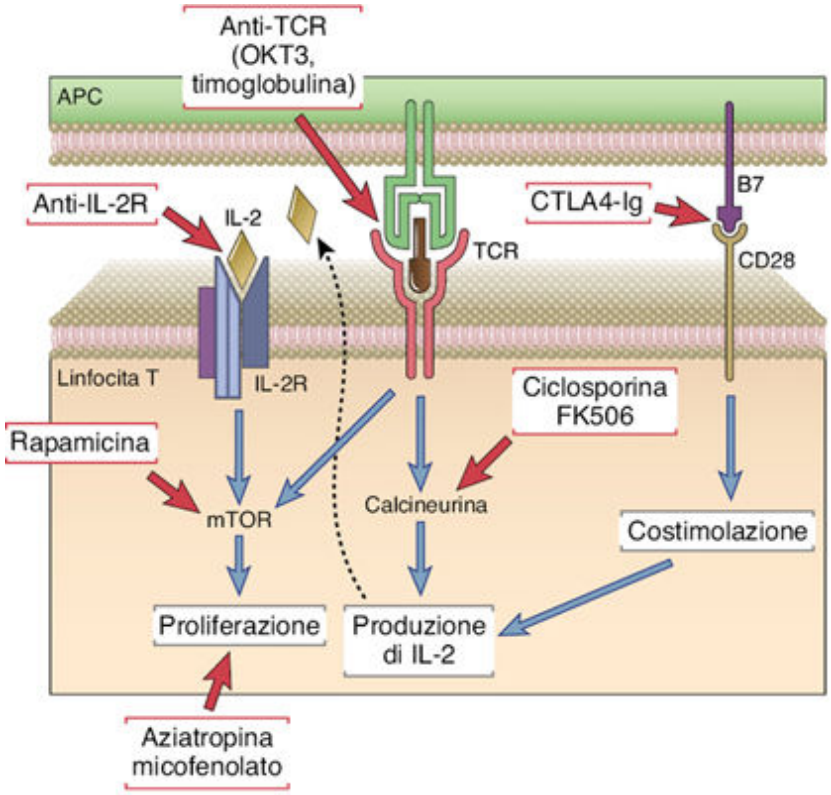


FIGURA 17-11 Meccanismi d'azione dei farmaci immunosoppressori. Nella figura sono rappresentate le principali categorie di farmaci usati per prevenire o trattare il rigetto dell'allotrapianto e sono riportati anche i bersagli molecolari dei farmaci.

Inibitori dell'attivazione dei linfociti T

Gli inibitori della calcineurina – ciclosporina e FK506 (tacrolimus) – inibiscono la trascrizione di alcuni geni dei linfociti T, in particolare quelli che codificano per le citochine, come interleuchina-2 (IL-2). La *ciclosporina* è un peptide ciclico di origine fungina, che si lega con alta affinità a una proteina cellulare ubiquitaria chiamata *ciclofillina*. Il complesso ciclosporina-ciclofillina si lega e inibisce l'attività enzimatica della calcineurina, una serinatreonina fosfatasi attivata dal complesso calcio/calmodulina (vedi Cap. 7). Poiché l'attivazione della calcineurina è necessaria per indurre il fattore di trascrizione NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*), la ciclosporina inibisce l'attivazione di NFAT e quindi la trascrizione dei geni dell'IL-2 e di altre citochine. Di conseguenza, la ciclosporina blocca la proliferazione indotta dall'IL-2 e la differenziazione dei linfociti T. L'FK506 è un macrolide di origine batterica che funziona in modo simile alla ciclosporina. L'FK506 e la proteina a cui si lega, nota come

FKBP (*FK Binding Protein*), condividono con il complesso ciclosporina-ciclofillina la capacità di legarsi alla calcineurina e inibirne l'attività.

L'introduzione della ciclosporina nella pratica clinica ha inaugurato l'era moderna dei trapianti. Prima del suo avvento, la maggior parte dei trapianti di cuore e fegato andava incontro a rigetto. Oggi, con l'uso di ciclosporina, FK506 e altri farmaci introdotti più recentemente, la maggior parte di questi trapianti sopravvive per più di 5 anni (Fig. 17-12). Ciononostante anche questi farmaci hanno dei limiti: per esempio, i livelli plasmatici di ciclosporina, necessari per un'immunosoppressione ottimale, provocano danni renali; inoltre alcuni episodi di rigetto sono refrattari all'azione di questo farmaco. L'FK506 è stato usato inizialmente nel trapianto di fegato, ma è oggi molto usato anche nei trapianti di rene, anche nei casi di rigetto non controllabile con ciclosporina.

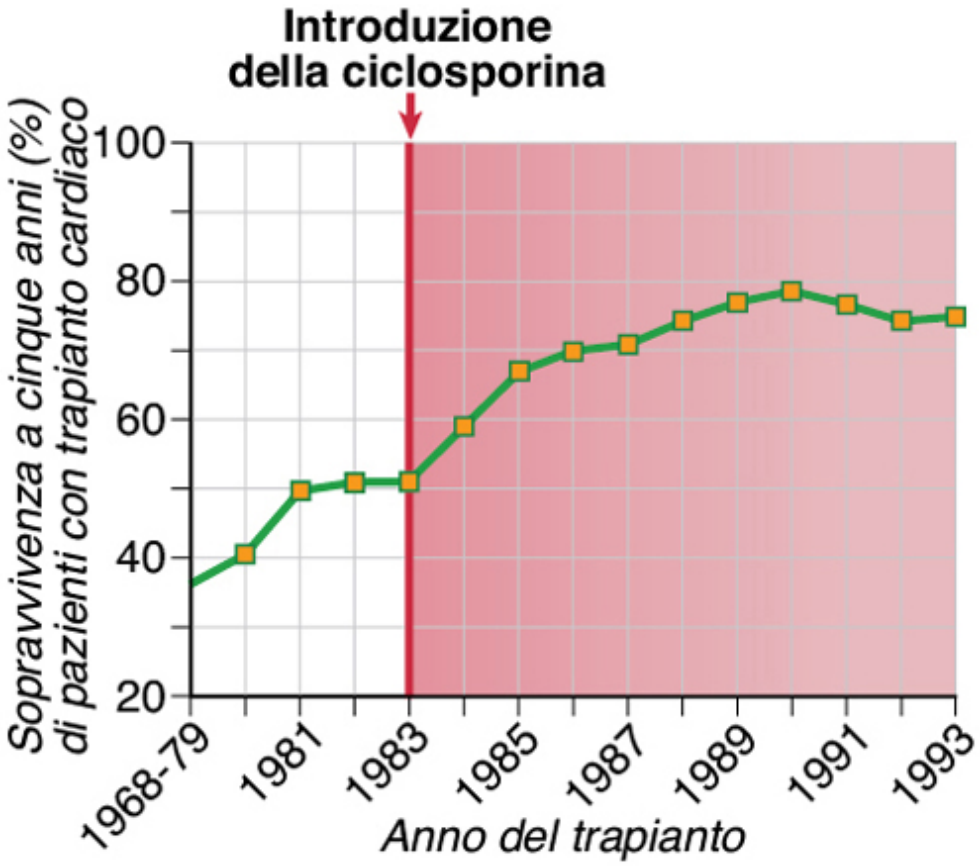


FIGURA 17-12 Influenza della ciclosporina sulla sopravvivenza del trapianto. Le percentuali di sopravvivenza a 5 anni dei pazienti che ricevono allotrapianti di cuore sono aumentate significativamente da quando è stata introdotta la ciclosporina, nel 1983. (*Dati tratti da Transplant Patient DataSource, United Network for Organ Sharing, Richmond, Va.*)

La rapamicina (sirolimus) inibisce la proliferazione dei linfociti T attivata da fattori di crescita. Come l'FK506, anche la rapamicina lega la proteina FKBP, ma il complesso rapamicina-FKBP non inibisce la calcineurina. Questo complesso invece lega e inibisce un enzima noto come mTOR (*mammalian Target Of Rapamicyn*), una serinatreonina chinasi necessaria per la traduzione delle proteine coinvolte nella sopravvivenza e nella proliferazione cellulare. L'azione di mTOR è inibita da un complesso proteico chiamato *complesso tubero-sclerosi 1* (TSC1)-TSC2. La fosforilazione della proteina chinasi Akt da parte della fosfatidilinositolo-3 chinasi (PI3K) porta alla fosforilazione di TSC2 e alla rimozione dell'inibizione di mTOR. Diversi recettori dei fattori di crescita, come il recettore dell'IL-2 dei linfociti T, oltre ai segnali che originano dall'attivazione di TCR e CD28, attivano mTOR attraverso il complesso PI3K-Akt e determinano la traduzione di proteine coinvolte nella progressione del ciclo cellulare. Quindi, inibendo la funzione di mTOR, la rapamicina blocca la proliferazione dei linfociti T. Le combinazioni di ciclosporina (che inibisce la sintesi dell'IL-2) e rapamicina (che blocca la proliferazione indotta dall'IL-2) funzionano da potenti inibitori della risposta T. È interessante notare che la rapamicina inibisce la generazione di cellule T effettrici, ma non interferisce con la sopravvivenza e le funzioni delle cellule T regolatorie, che possono così favorire l'immunosoppressione e sfavorire così il rigetto del trapianto. mTOR è coinvolto nelle funzioni delle cellule dendritiche e quindi la rapamicina può sopprimere le risposte T anche grazie ai suoi effetti sulle cellule dendritiche. Questo enzima gioca un ruolo anche nella proliferazione dei linfociti B e nelle risposte anticorpali, e quindi la rapamicina è efficace anche nel prevenire o controllare il rigetto dovuto all'azione degli anticorpi.

Sono ancora in fase precoce di sperimentazione farmaci immunosoppressori che agiscono sull'attivazione dei linfociti da parte di citochine e del TCR. Una di queste molecole bersaglio è JAK3, una protein chinasi legata alla trasduzione del segnale dei recettori di varie citochine, come l'IL-2, e la protein chinasi C, una chinasi essenziale nella trasduzione del segnale attivato dal TCR.

Antimetaboliti

Nel trattamento del rigetto del trapianto si utilizzano, in combinazione con altri farmaci, anche citostatici che uccidono i linfociti T proliferanti. Questi farmaci inibiscono la proliferazione dei precursori dei linfociti e uccidono le cellule T mature che sono state stimolate dagli alloantigeni. Il primo di questi farmaci a essere sviluppato per la prevenzione e il trattamento del rigetto è stata l'*azatioprina*. Questo farmaco è tuttora utilizzato, ma è caratterizzato da tossicità per i precursori midollari e per gli enterociti. Il farmaco più recente e comunemente usato di questa classe è il **mofetil micofenolato (MMF)**. L'MMF viene metabolizzato ad acido micofenolico, una sostanza che blocca un'isoforma, specifica dei linfociti, dell'inosina deidrossigenasi monofosfato, un enzima necessario per la sintesi dei nucleotidi che contengono la guanina. Per la sua azione selettiva, l'MMF ha effetti tossici relativamente modesti ed è attualmente usato in combinazione con la ciclosporina o l'FK506 per prevenire il rigetto acuto dell'allotrapianto.

Anticorpi antilinfociti in grado di eliminare o bloccare le funzioni dei linfociti

La terapia del rigetto acuto utilizza anche anticorpi che uccidono o inibiscono i linfociti T reagendo con alcune loro proteine di membrana. Il primo anticorpo anti-linfociti T usato in pazienti trapiantati è stato un anticorpo murino monoclonale chiamato OKT3, specifico per il recettore CD3 umano (OKT3 è stato il primo anticorpo monoclonale usato come farmaco negli esseri umani ma non è più in produzione). Per molti anni sono stati usati in clinica anticorpi policlonali di coniglio o di cavallo in grado di riconoscere le proteine di superficie dei linfociti T. Questi anticorpi depletano le cellule T circolanti sia attivando il sistema del complemento sia opsonizzando i linfociti T e favorendone la fagocitosi.

Nella pratica clinica sono attualmente utilizzati anticorpi monoclonali specifici per il recettore CD25, la subunità α del recettore dell'IL-2. Questo reagente può prevenire l'attivazione dei linfociti T bloccando il legame dell'IL-2 al suo recettore.

Un altro anticorpo monoclonale in uso clinico è costituito da un anticorpo monoclonale IgM di ratto specifico per CD52, una proteina di membrana espressa da molti linfociti T e B maturi di cui non si conosce ancora la

funzione. L'anticorpo anti-CD52 è stato inizialmente sviluppato per il trattamento delle neoplasie delle cellule B ed è stato notato che provocava una drastica diminuzione dei linfociti B e T periferici, un effetto che persisteva per molte settimane. Oggi, l'anticorpo viene somministrato appena prima e subito dopo il trapianto, nella speranza che possa indurre uno stato prolungato di tolleranza, eliminando lo sviluppo dei linfociti specifici per l'allotrapianto.

Il limite principale dell'uso degli anticorpi monoclonali o policlonali da specie diverse è dato dalla produzione, da parte dei pazienti trattati, di anticorpi neutralizzanti le immunoglobuline terapeutiche. Per questa ragione, sono stati sviluppati anticorpi chimerici ("umanizzati", a partire da quelli murini), per esempio contro le proteine CD3 e CD25) che mostrano ridotti livelli di immunogenicità.

Blocco delle molecole costimolatorie

I composti che bloccano le vie di costimolazione dei linfociti T riducono il rigetto acuto dei trapianti. Il meccanismo di azione di questo tipo di molecole è prevenire l'attivazione dei segnali costimolatori richiesti per l'attivazione dei linfociti T da parte delle APC (vedi Cap. 9). CTLA4-Ig è una proteina ricombinante composta dalla parte extracellulare di CTLA-4 fusa con il dominio Fc dell'IgG. Una forma a elevata affinità di CTLA4-Ig, che lega le molecole B7 sulle APC e previene la loro interazione con il CD28 espresso dai linfociti T (vedi Fig. 9-7), è approvata per l'uso nei riceventi di allotrapianto. Studi clinici hanno dimostrato che CTLA-4-Ig è efficace quanto la ciclosporina nel prevenire il rigetto acuto, ma il suo costo elevato e altri fattori hanno limitato la diffusione di questo farmaco biologico. Studi condotti su animali da esperimento hanno mostrato come un simile risultato possa essere ottenuto bloccando l'interazione del ligando di CD40 (CD40L), espresso dai linfociti T, con CD40, espresso dalle APC, mediante l'utilizzo di un anticorpo anti-CD40L (vedi Cap. 9). In alcuni protocolli sperimentali, il blocco simultaneo di B7 e di CD40 si è rivelato più efficace rispetto al blocco delle singole molecole. L'utilizzo dell'anticorpo anti-CD40L è tuttavia associato a serie complicazioni trombotiche, probabilmente dovute all'espressione di CD40L da parte delle piastrine.

Farmaci contro gli alloanticorpi e i linfociti B alloreattivi

Con il progredire delle conoscenze sul ruolo degli alloanticorpi nel rigetto acuto e cronico, sono state introdotte terapie precedentemente sviluppate per altri tipi di patologie che colpiscono gli anticorpi e le cellule B. Per esempio, con la plasmaferesi, utilizzata per trattare il rigetto acuto mediato da anticorpi, il sangue del paziente viene fatto passare attraverso una pompa che rimuove il plasma e reintroduce in circolo la frazione cellulare. Questa procedura permette di rimuovere gli anticorpi circolanti, inclusi quelli alloreattivi patogenetici. La terapia con immunoglobuline per via endovenosa (*IntraVenous Immune Globulin*, IVIG), spesso utilizzata in malattie infiammatorie su base anticorpale, è stata adattata anche al rigetto acuto mediato da anticorpi. In questa terapia, sono somministrate al paziente per via endovenosa IgG prelevate da diversi donatori sani. Il meccanismo d'azione non è stato ancora chiarito, ma probabilmente si basa sul fatto che le IgG iniettate si legano ai recettori per Fc espressi da diversi tipi cellulari del paziente, riducendo la produzione di alloanticorpi e bloccando le funzioni effettrici degli anticorpi del paziente. La terapia IVIG favorisce anche la degradazione degli anticorpi del paziente inibendo competitivamente il loro legame al recettore Fc neonatale (vedi Cap. 5). In alcuni casi di rigetto acuto mediato da anticorpi viene usata l'eliminazione dei linfociti B mediante somministrazione di rituximab, un anticorpo anti-CD20 approvato per il trattamento dei linfomi dei linfociti B e per malattie autoimmuni.

Farmaci antinfiammatori

I farmaci antinfiammatori sono regolarmente usati per ridurre la reazione infiammatoria contro l'allotrapianto; tra questi, i più potenti sono i corticosteroidi. Il meccanismo di azione proposto per questi ormoni naturali e i loro analoghi di sintesi è il blocco della sintesi e della secrezione di citochine, tra cui il fattore di necrosi tumorale (*Tumor Necrosis Factor*, TNF) e l'IL-1, e di altri mediatori dell'infiammazione, come prostaglandine e specie reattive dell'ossigeno e dell'ossido nitrico prodotti dai macrofagi e altre cellule infiammatorie. Questa terapia determina la riduzione del reclutamento leucocitario, dell'infiammazione e del danno al trapianto.

Gli attuali protocolli immunosoppressivi hanno radicalmente migliorato la sopravvivenza dei trapianti. Prima dell'avvento degli inibitori della calcineurina, il tasso di sopravvivenza a 1 anno del trapianto di rene da cadavere non consanguineo era del 50-60% e del 90% per il trapianto da donatore vivente parentale (che è il più compatibile con il ricevente). Dopo l'introduzione della ciclosporina, dell'FK506, della rapamicina e dell'MMF, il tasso di sopravvivenza a 1 anno del trapianto di rene da cadavere non parentale ha raggiunto il 90% circa. Anche il trapianto di cuore, per il quale la ricerca della compatibilità HLA non è perseguibile, è significativamente migliorato con l'avvento di varie classi di farmaci immunosoppressivi, come esposto nei paragrafi precedenti, e ha raggiunto un tasso di sopravvivenza a 1 anno intorno al 90% e un tasso di sopravvivenza a 5 anni intorno al 75% (vedi Fig. 17-11). Le esperienze con altri organi sono più limitate, ma anche in questi casi il tasso di sopravvivenza è migliorato grazie alle moderne terapie immunosoppressive; infatti per i trapianti di pancreas e fegato il tasso di sopravvivenza a 10 anni è rispettivamente del 60% e del 75% e per il trapianto di polmone è del 70-80% a 3 anni.

Il trattamento immunosoppressivo ha inizio nel momento in cui viene effettuato l'allotrapianto, con una combinazione di farmaci, e dopo pochi giorni i farmaci vengono cambiati al fine di mantenere a lungo l'immunosoppressione. Per esempio, in caso di trapianto di rene in pazienti adulti, vengono prima somministrati anticorpi anti-IL-2R o anti-linfociti T dotati di azione depletante e alte dosi di corticosteroidi, seguiti da una terapia di mantenimento che consiste in inibitori della calcineurina, un antimetabolita e a volte basse dosi di steroidi. Il rigetto acuto, quando si verifica, è trattato intensificando rapidamente la terapia immunosoppressiva. Nella trapiantologia moderna, il rigetto cronico è diventato la causa più frequente di insuccesso dell'allotrapianto, soprattutto in quello cardiaco. Il rigetto cronico è più insidioso di quello acuto ed è meno controllabile con la terapia immunosoppressiva.

L'immunosoppressione prolungata richiesta per una sopravvivenza a lungo termine del trapianto causa un aumento della suscettibilità alle infezioni intracellulari e ai tumori maligni associati a virus. In trapiantologia, l'obiettivo principale dell'immunosoppressione è ridurre la produzione e la funzionalità dei linfociti T helper e di CTL che mediano il rigetto cellulare acuto. Non è quindi sorprendente che anche le difese contro

i virus, funzione fisiologica dei linfociti T, risultino indebolite nei soggetti trapiantati sottoposti a immunosoppressione. Nei pazienti immunosoppressi è frequente soprattutto la riattivazione dell'infezione da herpes virus, come il citomegalovirus, il virus dell'herpes simplex, il virus della varicella zoster e il virus di Epstein-Barr. Per questa ragione, ai soggetti trapiantati viene oggi somministrata una terapia antivirale profilattica contro le infezioni da herpes virus. I pazienti che hanno ricevuto un allotrapianto e che sono sottoposti a terapia immunosoppressiva corrono un forte rischio di contrarre infezioni opportuniste, di infezioni cioè che normalmente non si presentano in soggetti immunocompetenti, come le infezioni fungine (polmonite da *Pneumocystis jiroveci*, istoplasmosi, coccidiomicosi), infezioni da protozoi (toxoplasmosi) e infezioni intestinali da parassiti (*Cryptosporidium* e *Microsporidium*). Questi soggetti hanno inoltre un aumentato rischio, rispetto alla popolazione immunocompetente, di sviluppare tumori, tra cui varie forme di tumori cutanei. Alcune neoplasie che si riscontrano più frequentemente nei pazienti trapiantati sono causate da virus e quindi potrebbero comparire per il ridotto livello di immunità antivirale. Tra esse vi sono il carcinoma della cervice uterina, che è legato all'infezione da papilloma virus, e i linfomi, causati dall'infezione da parte del virus di Epstein-Barr. I linfomi che si sviluppano nei pazienti allotrapiantati sono chiamati *malattie linfoproliferative post-trapianto* e derivano prevalentemente dai linfociti B.

Oltre all'aumentato rischio di infezioni e di insorgenza di tumori dovuti all'uso dei farmaci immunosoppressori, la maggiore limitazione associata all'utilizzo di molti di questi farmaci, come gli inibitori della calcineurina, gli inibitori di mTOR, gli antimetaboliti e gli steroidi, è la tossicità diretta verso cellule non correlate all'immunosoppressione. In alcuni casi la tossicità colpisce le stesse cellule colpite anche dal rigetto, come per esempio la tossicità della ciclosporina per le cellule epiteliali del tubulo renale, che può complicare l'interpretazione della riduzione della funzione renale nei pazienti con allotrapianto di rene.

Metodi per indurre la tolleranza specifica al donatore

Il rigetto dell'allotrapianto può essere evitato rendendo l'ospite tollerante agli alloantigeni del trapianto. In questo contesto, "tolleranza" significa che il sistema immunitario ospite non danneggia il trapianto, malgrado l'assenza

o la sospensione degli agenti immunosoppressori e antinfiammatori. Si presume che la tolleranza a un allotrapianto possa coinvolgere gli stessi meccanismi implicati nella tolleranza agli antigeni self (vedi Cap. 15), ossia l'induzione di anergia, la delezione e la soppressione delle cellule T alloreattive. La tolleranza al trapianto costituisce un enorme vantaggio perché è specifica per gli alloantigeni e quindi evita i problemi associati all'immunosoppressione aspecifica, cioè l'aumentata suscettibilità a infezioni, lo sviluppo di tumori e la tossicità da farmaci. Inoltre, la tolleranza al trapianto riduce il rigetto cronico, che fino a oggi non è stato possibile controllare in modo efficace con i comuni agenti immunosoppressori usati per prevenire e bloccare gli episodi di rigetto acuto.

Numerosi approcci sperimentali e osservazioni cliniche suggeriscono che la tolleranza al trapianto è un traguardo raggiungibile. Nel topo, in esperimenti con trapianti cutanei, Medawar e i suoi collaboratori hanno dimostrato che se a un neonato (ricevente) sono date cellule spleniche di un altro ceppo (donatore), il ricevente accetterà successivamente il trapianto da tale donatore. Questo tipo di tolleranza è specifica per l'alloantigene perché il ricevente rigetterà il trapianto da ceppi che esprimono alleli MHC diversi da quelli delle cellule di milza del donatore. I pazienti con trapianto renale che hanno ricevuto trasfusioni di sangue contenenti leucociti allogenici hanno una minore incidenza di episodi di rigetto acuto rispetto a quelli che non sono mai stati trasfusi. La possibile spiegazione per questa condizione è che l'introduzione dei leucociti allogenici presenti nelle trasfusioni provochi la tolleranza agli alloantigeni. Uno dei possibili meccanismi responsabili dell'induzione della tolleranza potrebbe essere legato all'eventuale presenza nelle cellule trasfuse del donatore di cellule dendritiche immature in grado di indurre la tolleranza agli alloantigeni. Infatti, il pretrattamento dei potenziali riceventi con trasfusioni di sangue è ora ampiamente usato come profilassi per ridurre il rigetto. In alcuni pazienti, l'allotrapianto di fegato può rimanere vitale anche dopo la sospensione della terapia immunosoppressiva. Il meccanismo di questa apparente tolleranza "spontanea" non è noto, ma sembra specifico del trapianto di questo organo.

La tolleranza specifica agli antigeni del donatore può essere indotta nel ricevente attraverso l'utilizzo di diverse strategie.

- ***Blocco della costimolazione***. È stato ipotizzato che il riconoscimento degli alloantigeni in assenza di costimolazione induca la tolleranza nei linfociti T e ci sono evidenze sperimentali negli animali a favore di questa ipotesi. L'esperienza clinica con agenti che bloccano la costimolazione, pur confermando la soppressione delle risposte contro l'allotrapianto, non ha tuttavia dimostrato l'induzione di una tolleranza duratura che possa eliminare la necessità di ricorrere alla terapia immunosoppressiva.
- ***Chimerismo ematopoietico***. Abbiamo già ricordato che le trasfusioni di leucociti dal donatore al ricevente inibiscono il rigetto. Se le cellule trasfuse o le cellule da queste derivate sopravvivono a lungo nel ricevente, quest'ultimo diventa una chimera. Una tolleranza a lungo termine all'allotrapianto mediante chimerismo emopoietico è stata ottenuta in un ridotto numero di pazienti con allotrapianto di rene grazie al trapianto di cellule midollari del donatore effettuato contemporaneamente all'allotrapianto d'organo. Il rischio di un trapianto di midollo e la disponibilità di donatori appropriati limitano l'utilizzo di questo approccio.
- ***Trasferimento o induzione di cellule T regolatorie***. Sono in corso esperimenti per tentare di generare *in vitro* cellule T regolatorie specifiche per il donatore che possano essere trasferite al ricevente. Alcuni successi si sono registrati nel caso di trapianto di cellule staminali ematopoietiche, in cui l'infusione di cellule T regolatorie ha ridotto la malattia dovuta alla reazione del trapianto contro l'ospite. Un approccio alternativo, che è stato tentato nel trapianto di isole pancreatiche, è attivare i linfociti T regolatori *in vivo* mediante somministrazione di un anticorpo anti-CD3 debolmente stimolante, ma l'efficacia di questa terapia non è stata stabilita.

TRAPIANTO XENOGENICO

Il trapianto di organi solidi a scopo terapeutico è notevolmente limitato dalla scarsa disponibilità di donatori. Per questa ragione, la possibilità di utilizzare organi da altri mammiferi, come i maiali, in riceventi umani ha suscitato un grande interesse.

Una delle principali barriere immunologiche al trapianto xenogenico è la presenza di anticorpi naturali nei riceventi umani, che provocano il rigetto iperacuto. Più del 95% dei primati ha anticorpi naturali (IgM) che riconoscono i determinanti carboidratici espressi dalle cellule di specie evolutivamente distanti, come i maiali. La grande maggioranza degli anticorpi umani naturali antimaiale è diretta contro un particolare carboidrato formato per azione dell'enzima α-galattosiltransferasi. Questo enzima posiziona un α-galattosio su un substrato che nelle cellule dell'uomo e di altri primati è invece fucosilato per formare l'antigene H dei gruppi sanguigni. Gli anticorpi naturali raramente sono prodotti contro i carboidrati di specie concordanti strettamente correlate, come l'uomo e gli scimpanzé. Pertanto, gli organi di scimpanzé o di altri primati superiori possono essere teoricamente accettati dalla specie umana; tuttavia, queste procedure sono state limitate da problemi sia etici sia logistici. Per ragioni di compatibilità anatomica, i maiali sono la specie xenogenica di elezione per la donazione all'uomo.

Gli anticorpi naturali contro gli xenotrapianti inducono un rigetto iperacuto con lo stesso meccanismo osservato nel rigetto iperacuto dell'allotrapianto. Questi meccanismi includono la produzione da parte delle cellule endoteliali di sostanze con azione procoagulante o che promuovono l'aggregazione piastrinica e contemporaneamente la perdita dei meccanismi anticoagulanti. Le conseguenze dell'attivazione del complemento umano sulle cellule porcine sono tuttavia generalmente più gravi rispetto a quelle legate all'attivazione da parte di anticorpi naturali sulle cellule allogeniche umane. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che alcune proteine regolatorie del complemento, prodotte dalle cellule porcine, come il fattore di accelerazione del decadimento, non sono in grado di interagire con le proteine del complemento umano e quindi non possono limitare il danno (vedi Cap. 13).

Anche prevenendo il rigetto iperacuto, gli xenotrapianti sono spesso danneggiati da una forma di rigetto vascolare acuto che si verifica entro 2-3 giorni dal trapianto. Questa forma è stata definita *rigetto ritardato dello xenotrapianto*, *rigetto acuto accelerato* oppure *rigetto vascolare acuto* ed è caratterizzata da trombosi intravascolare e necrosi fibrinoide delle pareti vascolari. I meccanismi di questo tipo di rigetto non sono del tutto noti; dati recenti indicano che l'incompatibilità tra le piastrine dei primati e le cellule

endoteliali porcine provocherebbe la trombosi, indipendentemente dal danno dovuto agli anticorpi.

Gli xenotrapianti possono anche essere rigettati a causa di una risposta T. Si ritiene che i meccanismi del rigetto cellulo-mediato degli xenotrapianti siano simili a quelli già descritti per il rigetto dell'allotrapianto e che le risposte dei linfociti T agli xenoantigeni possano essere persino più forti di quelle agli alloantigeni.

TRASFUSIONE DI SANGUE E ANTIGENI DEI GRUPPI SANGUIGNI AB0 E Rh

La trasfusione di sangue è una forma di trapianto in cui il sangue intero o le cellule del sangue di uno o più donatori sono trasferiti per via endovenosa. Le trasfusioni sono in genere eseguite per ripristinare il sangue perduto dopo un'emorragia o per correggere anomalie causate da una produzione inadeguata di cellule ematiche, condizione che si verifica in varie malattie. Il maggiore ostacolo al successo delle trasfusioni di sangue è la risposta immunitaria alle molecole di superficie che sono diverse tra gli individui. Il sistema alloantigenico più importante nella trasfusione di sangue è quello AB0, che sarà discusso in dettaglio più avanti. Gli antigeni AB0 sono espressi teoricamente su tutte le cellule, inclusi i globuli rossi. I soggetti privi di un particolare antigene di gruppo sanguigno producono anticorpi naturali IgM contro questo antigene, probabilmente come risultato di risposte ad antigeni cross-reattivi espressi sui batteri che colonizzano l'intestino. Se a tali soggetti sono trasferite cellule ematiche che esprimono l'antigene bersaglio, gli anticorpi preesistenti si legano alle cellule trasfuse, attivano il complemento e causano **reazioni trasfusionali** che possono essere anche letali. La trasfusione attraverso una barriera AB0 può scatenare un'immediata reazione emolitica, provocando sia la lisi intravascolare dei globuli rossi, verosimilmente mediata dal sistema del complemento, sia la fagocitosi massiva degli eritrociti legati agli anticorpi e al complemento da parte dei macrofagi epatici e splenici. L'emoglobina viene liberata dai globuli rossi lisati in quantità tali da risultare tossica per le cellule renali, provocando una necrosi acuta delle cellule tubulari e l'insufficienza renale.

Possono anche comparire febbre elevata, shock e coagulazione intravascolare disseminata come conseguenza del rilascio massiccio di citochine (per esempio TNF o IL-1). La coagulazione intravascolare disseminata consuma i fattori della coagulazione più velocemente di quanto essi possano essere sintetizzati e il paziente può paradossalmente morire di emorragia in presenza di coagulazione diffusa. Reazioni emolitiche più tardive possono comparire come risultato di incompatibilità degli antigeni minori del gruppo sanguigno. Questi provocano una progressiva perdita dei globuli rossi trasfusi, portando ad anemia e ittero, quest'ultimo come conseguenza del sovraccarico epatico di pigmenti derivati dall'emoglobina.

Prendiamo ora in esame gli antigeni del gruppo sanguigno AB0 e di altri gruppi che possono avere rilevanza clinica.

Antigeni del gruppo sanguigno AB0

Gli antigeni AB0 sono carboidrati legati a proteine di membrana sintetizzati dalle glicosiltransferasi, enzimi polimorfi la cui attività dipende dagli alleli ereditati (Fig. 17-13). Gli antigeni AB0 rappresentano il primo sistema di alloantigeni identificato nei mammiferi. Tutti gli individui normali sintetizzano una struttura comune di glicano, che è attaccato prevalentemente alle proteine della membrana plasmatica. La maggior parte dei soggetti possiede una fucosiltransferasi che aggiunge un residuo di fucosio a un residuo non terminale di zucchero della struttura di glicano e il glicano fucosilato è chiamato *antigene H*. Un singolo gene sul cromosoma 9 codifica per una glicosiltransferasi che può modificare ulteriormente l'antigene H. Esistono tre varianti alleliche di questo gene. Il gene dell'allele 0 è sprovvisto di attività enzimatica. L'enzima codificato dall'allele A trasferisce un residuo terminale di *N*-acetilgalattosamina sull'antigene H, mentre il prodotto del gene dell'allele B ne trasferisce uno di galattosio. I soggetti omozigoti per l'allele 0 non possono coniugare nessuno zucchero all'antigene H ed esprimono solo l'antigene H. Invece i soggetti che dispongono di almeno un allele A (omozigoti AA, eterozigoti A0 o eterozigoti AB) formano l'antigene A aggiungendo una *N*-acetilgalattosamina ad alcuni dei loro antigeni H. Analogamente, i soggetti che esprimono un allele B (omozigoti BB, eterozigoti B0 ed eterozigoti AB) formano l'antigene B aggiungendo un galattosio ad alcuni dei loro antigeni

H. Gli eterozigoti AB formano antigeni sia A sia B da alcuni dei loro antigeni H. La terminologia è stata semplificata in modo che i soggetti 00 siano di gruppo 0, i soggetti AA e A0 siano di gruppo A, i soggetti BB e BO siano di gruppo B e i soggetti AB siano di gruppo AB. Le mutazioni del gene che codifica per la fucosiltransferasi che produce l'antigene H sono rare; gli individui omozigoti per tale mutazione si dice che hanno il *gruppo sanguigno Bombay* e non possono produrre antigeni H, A o B e non possono ricevere sangue di tipo 0, A, B o AB.

Nelle trasfusioni, la scelta del donatore si basa sull'espressione degli antigeni dei gruppi sanguigni e delle risposte anticorpali contro tali antigeni. Se un paziente riceve una trasfusione di globuli rossi da un donatore che esprime una forma di antigene non espressa dalle proprie emazie, si avrà una reazione trasfusionale (descritta precedentemente). Ne consegue che gli individui AB possono tollerare trasfusioni da tutti i donatori potenziali e sono quindi detti *riceventi universali*. Allo stesso modo, i soggetti 0 possono tollerare trasfusioni solo da donatori 0, ma possono donare sangue a tutti i riceventi e sono infatti detti *donatori universali*. In generale, le differenze minori tra i gruppi sanguigni portano a lisi delle emazie solo dopo trasfusioni ripetute che hanno provocato una risposta anticorpale secondaria.

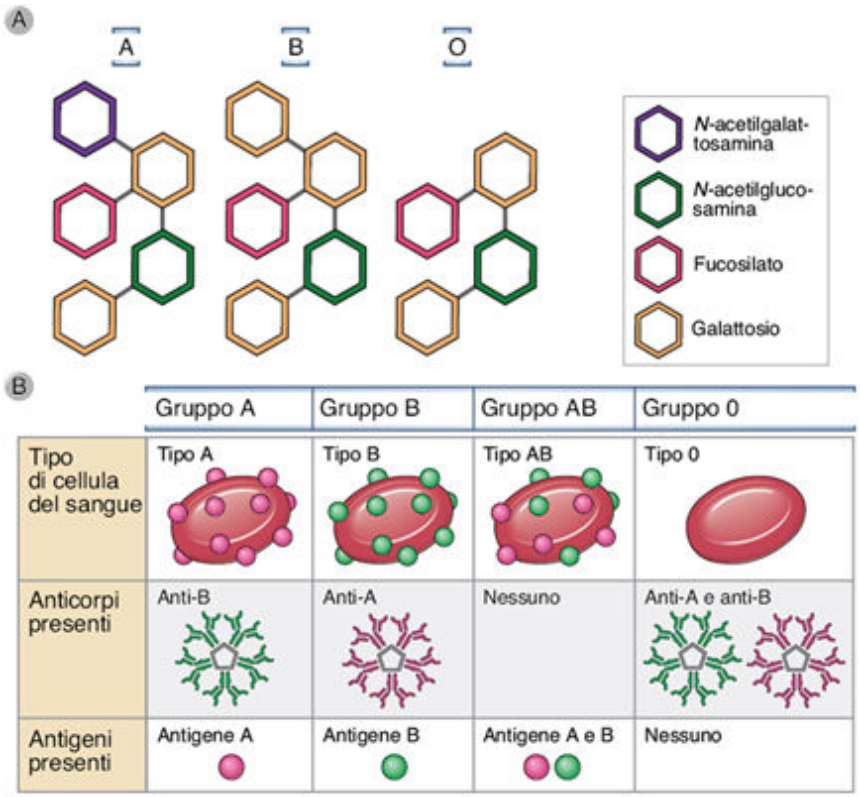


FIGURA 17-13 Antigeni AB0 ematici. **A.** Gli antigeni del gruppo sanguigno sono molecole di carboidrati legate a proteine o lipidi presenti sulla superficie cellulare per azione di glicosiltransferasi (vedi testo). **B.** I diversi gruppi sanguigni sono il risultato dell'aggiunta di zuccheri diversi per azione delle diverse glicosiltransferasi ereditarie. Gli individui che esprimono un particolare antigene sono tolleranti a quell'antigene ma producono anticorpi naturali che reagiscono con antigeni di altri gruppi sanguigni.

Gli individui che esprimono un particolare antigene del gruppo sanguigno A o B sono tolleranti a quell'antigene, ma gli individui che non esprimono quell'antigene producono anticorpi naturali che riconoscono l'antigene. Virtualmente, tutti i soggetti esprimono l'antigene H e pertanto sono tolleranti a questo antigene e non producono anticorpi anti-H. Gli individui che esprimono antigeni A o B sono tolleranti a queste molecole e non producono anticorpi anti-A o anti-B, rispettivamente. I soggetti di gruppo sanguigno 0 e A producono tuttavia anticorpi IgM anti-B, mentre i soggetti di gruppo sanguigno 0 e B producono anticorpi IgM anti-A. I soggetti che non sono in grado di produrre epitopi dell'antigene H producono anticorpi contro gli antigeni H, A e B. In verità, sembra paradossale che individui che non esprimono l'antigene di un gruppo sanguigno producano anticorpi contro quell'antigene. La spiegazione più

probabile è che gli anticorpi siano prodotti contro i glicolipidi dei batteri intestinali e cross-reagiscano con gli antigeni AB0, a meno che l'individuo non sia tollerante a uno o più di questi antigeni. Probabilmente, la presenza di qualsiasi antigene di un gruppo sanguigno induce la tolleranza a quell'antigene.

Gli antigeni dei gruppi sanguigni A e B sono espressi su molti altri tipi di cellule oltre a quelle del sangue, comprese le cellule endoteliali. Per questa ragione, la tipizzazione AB0 è fondamentale per evitare il rigetto iperacuto di allotrapianti di organi solidi, come già discusso in questo capitolo. L'incompatibilità AB0 tra madre e feto di solito non provoca problemi per il feto, perché gli anticorpi anticarboidrati sono IgM e non possono oltrepassare la placenta.

Antigeni di altri gruppi sanguigni

Antigene Lewis

Lo stesso glicosfingolipide che reca i determinanti dei gruppi sanguigni A e B può essere modificato da altre glicosiltransferasi, generando antigeni minori che possono provocare reazioni trasfusionali più lievi. Per esempio, l'aggiunta di fucosio a una catena laterale può essere catalizzata da differenti fucosiltransferasi e creare epitopi del sistema antigenico Lewis. Gli antigeni Lewis hanno di recente ricevuto molta attenzione da parte degli immunologi perché questi carboidrati servono da ligandi per la E- e la P-selectina e svolgono quindi un ruolo nella migrazione dei leucociti (vedi Cap. 3).

Antigene Rhesus (Rh)

L'antigene Rhesus (Rh), il cui nome deriva dalla specie di scimmie in cui fu originariamente identificato, è un altro antigene clinicamente importante. Gli antigeni Rh sono proteine idrofobiche, non glicosilate, presenti sulla membrana dei globuli rossi e strutturalmente correlate ad altre glicoproteine di membrana con funzioni di trasporto. Le proteine Rh sono codificate da due geni strettamente correlati e altamente omologhi, ma solo uno, detto *RhD*, è solitamente preso in considerazione, poiché fino al 15% della popolazione presenta una delezione o altre alterazioni di questo allele.

Questi soggetti, detti *Rh-negativi*, non sono tolleranti verso l'antigene RhD e possono produrre anticorpi se sono esposti a globuli rossi Rh-positivi.

Il principale significato clinico degli anticorpi anti-Rh è legato a reazioni emolitiche associate alla gravidanza, simili alla reazione trasfusionale. Le madri Rh-negative che hanno un feto Rh-positivo possono essere sensibilizzate da globuli rossi fetali che penetrano nella circolazione materna, di solito durante il parto. Dal momento che l'antigene Rh è proteico e non un carboidrato come gli antigeni AB0, si generano nella madre Rh-negativa anche anticorpi IgG. Le successive gravidanze in cui il feto è Rh-positivo sono a rischio perché gli anticorpi materni IgG anti-Rh possono attraversare la placenta e causare la distruzione dei globuli rossi fetali. Questo causa l'**eritroblastosi fetale** (malattia emolitica del neonato) che può essere letale per il feto. La malattia può essere prevenuta somministrando alla madre anticorpi anti-RhD entro 72 ore dalla nascita del primo figlio Rh-positivo. Il trattamento uccide i globuli rossi Rh-positivi del figlio che sono entrati in circolo e impedisce la sensibilizzazione e la produzione di anticorpi anti-Rh nella madre. L'esatto meccanismo di azione degli anticorpi non è ancora chiaro, ma può consistere nella clearance fagocitica o nella lisi mediata da complemento degli eritrociti oppure nell'inibizione dei linfociti B della madre specifici per RhD, tramite feedback negativo da parte del recettore per Fc (vedi Cap. 12).

TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche pluripotenti (HSC) è stato realizzato nel passato tramite l'inoculo di cellule di midollo osseo raccolte per aspirazione; questa procedura viene spesso chiamata *trapianto di midollo osseo*. Nella pratica clinica moderna, le cellule staminali ematopoietiche vengono più spesso ottenute dal sangue dei donatori, soprattutto dopo il trattamento con i fattori di stimolazione delle colonie (*Colony-Stimulating Factors*, CSF), che causano la mobilizzazione delle cellule staminali dal midollo osseo. Il ricevente è trattato prima del trapianto con una combinazione di chemioterapia, immunoterapia o radioterapia per depletare

le cellule midollari e liberare così le nicchie per le cellule staminali trapiantate. In seguito al trapianto, le cellule staminali ripopolano il midollo osseo del ricevente con la loro progenie in grado di differenziarsi. Si è scelto di trattare il trapianto di HSC in un paragrafo a sé, perché è caratterizzato da molti aspetti che sono specifici di questa forma di trapianto e che non si osservano nel trapianto di organi solidi.

Il trapianto di HSC viene usato principalmente nel trattamento delle leucemie e delle condizioni pre-leucemiche. Si tratta, infatti, dell'unico trattamento eradicativo di alcune di queste malattie, tra cui la leucemia linfatica cronica e la leucemia mieloide cronica. Il meccanismo attraverso il quale il trapianto di HSC eradica le neoplasie ematopoietiche è l'effetto trapianto contro tumore, nel quale il sistema immunitario ricostituito del donatore riconosce le cellule tumorali residue come estranee e le distrugge. Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche è usato in clinica anche per trattare le malattie causate da mutazioni dei geni che riguardano esclusivamente le cellule derivanti da quelle ematopoietiche, come i linfociti o i globuli rossi. Si possono trattare con il trapianto di cellule ematopoietiche malattie come la deficienza di adenosina deaminasi, l'immunodeficienza severa combinata legata al cromosoma X, le mutazioni dell'emoglobina, come la β-talassemia nella sua forma più grave e l'anemia falciforme.

Le cellule staminali ematopoietiche allogeniche sono rigettate anche da un ospite debolmente immunocompetente, pertanto sia il donatore sia il ricevente devono essere attentamente scelti per la condivisione di tutti i loci MHC. I meccanismi del rigetto non sono completamente noti ma, oltre ai meccanismi immunitari specifici, il rigetto delle cellule ematopoietiche staminali può essere mediato anche dalle cellule NK, come dimostrato in modelli sperimentali animali. Topi ibridi F_1 irradiati rigettano il midollo osseo di entrambi i genitori e questo fenomeno, noto come *resistenza dell'ibrido* (all'attecchimento di midollo osseo parentale; *N.d.T.*) o HR (*da Hybrid Resistance*), sembra contraddire le leggi classiche del rigetto di trapianto di organi. L'HR è stata osservata in topi con deficit di linfociti T e la deplezione delle cellule NK del ricevente previene tale rigetto. L'HR è probabilmente dovuta alla reattività delle cellule NK del ricevente nei confronti dei precursori midollari che non esprimono le molecole MHC di classe I espresse dall'ospite. Ricordiamo che di regola il riconoscimento delle molecole self di classe I inibisce l'attivazione delle cellule NK e, se

queste molecole self mancano, le cellule NK non sono più inibite (vedi Fig. 4-8).

Anche dopo il successo di un trapianto, due ulteriori problemi sono frequentemente associati al trapianto di HSC: la reazione del trapianto contro l'ospite e l'immunodeficienza.

Reazione del trapianto contro l'ospite

La reazione del trapianto contro l'ospite* (Graft-Versus-Host Disease, *GVHD) è causata dalla reazione dei linfociti T maturi dell'inoculo di HSC contro gli alloantigeni dell'ospite. Questa reazione si presenta in quanto l'ospite è immunocompromesso e pertanto incapace di rigettare le cellule allogeniche del trapianto. Nella maggior parte dei casi, la reazione è diretta contro gli antigeni minori di istocompatibilità, dato che il trapianto di midollo osseo non viene solitamente eseguito in presenza di differenze nelle molecole MHC tra donatore e ricevente. La GVHD compare anche quando vengono trapiantati organi solidi contenenti un numero significativo di linfociti T, come l'intestino tenue, il polmone e il fegato.

La GVHD rappresenta la principale limitazione al successo del trapianto di midollo osseo. Immediatamente dopo il trapianto di HSC, vengono somministrati farmaci immunosoppressivi per la profilassi anti-GVHD, come gli inibitori della calcineurina ciclosporina e tacrolimus, antimetaboliti come metotrexate e l'inibitore di mTOR siromilus. Malgrado queste strategie profilattiche aggressive, la GVHD rappresenta la principale causa di mortalità nei riceventi di trapianto di midollo osseo. Questa malattia può essere classificata, sulla base dei quadri istologici, in forme acute e croniche.

La **GVHD acuta** è caratterizzata dalla morte delle cellule epiteliali della cute (Fig. 17-14), del fegato (epitelio biliare) e del tratto gastrointestinale. Si manifesta clinicamente con eruzione cutanea, ittero, diarrea ed emorragia gastrointestinale. Quando la morte delle cellule epiteliali è estesa, la cute o il rivestimento intestinale si sfaldano completamente. In questi casi, la reazione può essere fatale.

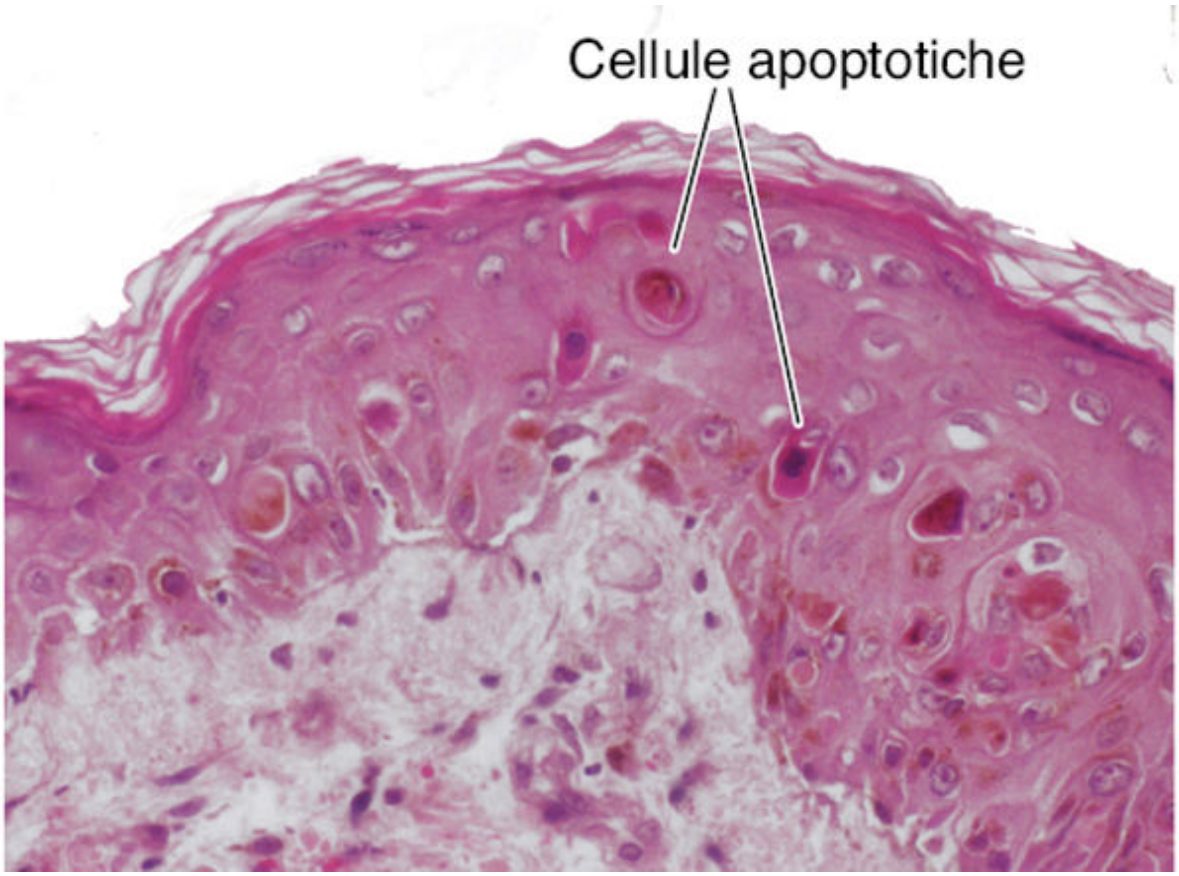


FIGURA 17-14 Istopatologia della GVHD acuta nella cute. Si può osservare uno scarso infiltrato linfocitario alla giunzione dermoepidermica ed è evidente il danno allo strato epiteliale sotto forma di vacuolizzazione alla giunzione dermoepidermica, cellule con anomala colorazione della cheratina (discheratosi) e disorganizzazione della maturazione dei cheratinociti dallo strato basale alla superficie. (*Per gentile concessione del Dr. Scott Grantor, Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts.*)

La **GVHD cronica** è caratterizzata da fibrosi e atrofia di uno o più di questi stessi organi, in assenza di evidente morte cellulare acuta. La GVHD cronica può anche coinvolgere i polmoni e provocare l'obliterazione delle piccole vie aeree, una bronchiolite obliterante, simile a quella osservata nel rigetto cronico di allotrapianti di polmone. Nella sua forma più grave, porta all'insufficienza funzionale completa dell'organo interessato e può essere fatale.

Nei modelli animali, la GVHD acuta viene iniziata da linfociti T maturi trasferiti con le HSC e l'eliminazione dei linfociti T maturi del donatore dal trapianto può prevenire la comparsa di GVHD. Nel trapianto clinico di HSC, lo sforzo per eliminare i linfociti T dall'inoculo ha ridotto l'incidenza di GVHD ma ha anche ridotto l'effetto del trapianto contro la leucemia, un

aspetto che è particolarmente importante per il trattamento della leucemia con questo approccio. Inoltre, i preparati di HSC privati di linfociti T presentano una maggiore difficoltà di attecchimento, probabilmente a causa dell'assenza dei fattori stimolanti colonie prodotti dai linfociti T maturi, e questo è un aspetto importante per il ripopolamento delle cellule staminali.

Malgrado la GVHD sia innescata da linfociti T trapiantati che riconoscono gli alloantigeni dell'ospite, le cellule effettrici che provocano il danno delle cellule epiteliali non sono ben definite. All'esame istologico, le cellule NK sono spesso trovate adese alle cellule epiteliali danneggiate e questo suggerisce che le cellule NK siano importanti cellule effettrici della GVHD acuta. Anche CTL $CD8^+$ e le citochine sembrano essere coinvolti nel danno tissutale della GVHD acuta.

La relazione tra GVHD cronica e GVHD acuta non è nota e pone problemi simili a quelli del rapporto tra il rigetto cronico e quello acuto dell'allotrapianto. Per esempio, la GVHD cronica potrebbe rappresentare una risposta fibrotica che tenta di riparare i tessuti danneggiati dalla perdita acuta di cellule epiteliali; tuttavia, la GVHD cronica può insorgere senza alcuna evidenza di una precedente forma acuta. Una spiegazione alternativa è che la GVHD cronica rappresenti una risposta all'ischemia causata dal danno vascolare.

Entrambe le forme di GVHD, acuta e cronica, vengono comunemente controllate con una pesante terapia immunosoppressiva, per esempio mediante dosi elevate di steroidi, ma molti pazienti non rispondono positivamente. Gli insuccessi terapeutici possono essere dovuti al fatto che questi trattamenti controllano solo alcuni dei molti meccanismi effettori coinvolti nella GVHD e al fatto che alcuni trattamenti eliminano linfociti T regolatori, importanti per prevenire la GVHD. A causa della sua elevata mortalità, la GVHD acuta rappresenta il principale ostacolo al successo del trapianto di HSC. Terapie sperimentali in via di sviluppo includono anticorpi anti-TNF e trasferimento di linfociti T regolatori.

Immunodeficienza conseguente al trapianto di cellule staminali ematopoietiche

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche è spesso accompagnato dall'immunodeficienza clinica. Numerosi fattori possono contribuire a un

deficit della risposta immunitaria nei riceventi, che possono essere incapaci di rigenerare un repertorio linfocitario completo. Inoltre, l'irradiazione e la chemioterapia usate nel condizionamento del paziente per il trapianto, probabilmente depletano le cellule della memoria e le plasmacellule, che potrebbero richiedere tempi lunghi per essere rigenerate.

Ne consegue che i riceventi sono suscettibili alle infezioni virali, in particolare a quelle da citomegalovirus, e a molte infezioni batteriche. Inoltre, sono anche soggetti ai linfomi a cellule B provocati dal virus di Epstein-Barr. L'immunodeficienza che si instaura a seguito del trapianto di cellule staminali ematopoietiche può essere più grave rispetto a quella che si osserva nei pazienti immunodepressi in modo convenzionale; quindi i riceventi solitamente ricevono una profilassi antibiotica, una profilassi antivirale per impedire le infezioni da citomegalovirus, una profilassi antifungina per impedire l'infezione invasiva da *Aspergillus* e infusioni endovenose di immunoglobuline (IVIG) di mantenimento. I riceventi sono anche immunizzati contro infezioni comuni, per ripristinare l'immunità protettiva persa con il trapianto.

C'è un grande interesse nell'utilizzo delle cellule staminali pluripotenti per la riparazione di tessuti dotati di una limitata capacità rigenerativa, come il muscolo cardiaco, il cervello e il midollo spinale. Un primo approccio si basa sull'utilizzo di cellule staminali di origine embrionale, cellule pluripotenti che derivano da embrioni umani nella fase di blastocisti. Anche se le cellule staminali embrionali non sono ancora state usate diffusamente in ambito clinico, è probabile che un ostacolo importante alla riuscita del loro trapianto sia la loro alloantigenicità e il rigetto da parte del sistema immunitario del ricevente. Una possibile soluzione a tale problema può venire dall'utilizzo di cellule pluripotenti derivate *in vitro* da cellule tissutali somatiche adulte in seguito a trasduzione di specifici geni. Il vantaggio immunologico che ne deriva consiste nel fatto che queste cellule possono essere ottenute da qualsiasi cellula somatica del paziente e quindi non siano rigettate.

RIEPILOGO

* Il trapianto di tessuti da un individuo a un ricevente geneticamente diverso causa una risposta immunitaria specifica, nota come rigetto, che può distruggere il trapianto. I

principali bersagli molecolari nel rigetto sono le molecole MHC allogeniche di classe I e classe II.

* Le molecole MHC allogeniche come tali possono essere presentate dai linfociti T del ricevente direttamente sulla superficie delle APC del donatore (via diretta) oppure gli alloantigeni possono essere internalizzati dalle APC dell'ospite che infiltrano il trapianto o risiedono negli organi linfoidi drenanti ed essere processati e presentati ai linfociti T come peptidi associati a molecole MHC self (via indiretta).
* La frequenza dei linfociti T capaci di riconoscere molecole MHC allogeniche è molto alta; questo spiega perché la risposta agli alloantigeni sia più forte della risposta a un normale antigene non self.
* Il rigetto del trapianto è mediato dai linfociti T, inclusi CTL, che uccidono le cellule del trapianto, dai linfociti T helper, che causano la reazione DTH, e dagli anticorpi.
* Numerosi meccanismi effettori sono alla base del rigetto degli organi trapiantati. Gli anticorpi preesistenti specifici per il gruppo sanguigno del donatore o antigeni MHC provocano il rigetto iperacuto, caratterizzato dalla trombosi dei vasi del trapianto. I linfociti T alloreattivi e gli anticorpi prodotti in risposta al trapianto causano il rigetto acuto, caratterizzato dal danno alle pareti vascolari del trapianto e dalla morte delle cellule parenchimali. Il rigetto cronico è caratterizzato dalla fibrosi e da stenosi arteriosa (vascolopatia del trapianto) che potrebbe essere dovuta a reazioni infiammatorie mediate da linfociti T o da citochine.
* Il rigetto del trapianto può essere prevenuto o trattato mediante immunosoppressione dell'ospite e riducendo al minimo l'immunogenicità del trapianto (per esempio limitando le differenze alleliche MHC). Gran parte dell'immunosoppressione è diretta principalmente a inibire la risposta dei linfociti T e comporta l'uso di farmaci citotossici, agenti immmunosoppressori specifici e anticorpi anti-cellule T. I farmaci immunosoppressivi più ampiamente utilizzati hanno come bersaglio la calcineurina, mTOR e la sintesi del DNA dei linfociti. L'immunosoppressione è ottenuta mediante farmaci antinfiammatori, come i corticosteroidi, che inibiscono la sintesi di citochine da parte dei macrofagi e di altre cellule.
* L'immunosoppressione dei pazienti che ricevono il trapianto di un organo solido causa una condizione di immunodeficienza che aumenta la suscettibilità alle infezioni virali e ai tumori maligni correlati a infezioni virali.
* L'utilizzo del trapianto xenogenico di organi solidi è limitato dalla presenza di anticorpi naturali contro i carboidrati presenti sulle cellule di specie differenti che causano il rigetto iperacuto, il rigetto vascolare acuto mediato da anticorpi, una potente risposta dei linfociti T verso le molecole MHC xenogeniche ed effetti protrombotici dell'endotelio xenogenico sulle piastrine umane e sulle proteine della coagulazione.
* Gli antigeni ematici del gruppo AB0 sono un insieme di strutture carboidratiche polimorfe presenti sulle cellule del sangue e sull'endotelio, che limitano le trasfusioni e il trapianto degli organi solidi. Gli anticorpi IgM naturali preesistenti anti-A o anti-B sono presenti in individui che non esprimono sulle loro cellule gli antigeni A o B, rispettivamente. Questi anticorpi possono causare reazioni trasfusionali e il rigetto iperacuto dell'allotrapianto.
* Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSC) viene eseguito per trattare leucemie o difetti genetici limitati alle cellule ematopoietiche, è suscettibile al rigetto e i riceventi devono essere sottoposti a un'intensa immunosoppressione preparatoria. Inoltre, i linfociti T del donatore presenti nei trapianti di HSC possono rispondere agli alloantigeni dell'ospite causando GVHD. La GVHD acuta è caratterizzata dalla morte delle cellule epiteliali della cute, del tratto intestinale e del fegato e può essere fatale. La GVHD cronica

è caratterizzata da fibrosi e dall'atrofia di uno o più degli stessi organi bersaglio, nonché dei polmoni, e può essere fatale. I pazienti che ricevono il trapianto di cellule staminali ematopoietiche spesso sviluppano anche una grave immunodeficienza, che li rende suscettibili alle infezioni.

LETTURE CONSIGLIATE

Riconoscimento e rigetto dei trapianti allogenici

Baldwin W.M.; Valujskikh A.; Fairchild R.L: Antibody-mediated rejection: emergence of animal models to answer clinical questions. *American Journal of Transplantation* 10:1135–1142 (2010).

Colvin R.B.; Smith R.N: Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nature Review Immunology* 5:807–817 (2005).

Gras S.; Kjer-Nielsen L.; Chen Z.; Rossjohn J.; McCluskey J: The structural bases of direct T-cell allorecognition: implications for T-cell-mediated transplant rejection. *Immunology and Cell Biology* 89:388–395 (2011).

Kinnear G.; Jones N.D.; Wood K.J: Costimulation blockade: current perspectives and implications for therapy. *Transplantation* 95:527–535 (2013).

Lakkis F.G.; Lechler R.I: Origin and biology of the allogeneic response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3:1–10 (2013).

LaRosa D.F.; Rahman A.H.; Turka L.A: The innate immune system in allograft rejection and tolerance. *Journal of Immunology* 178:7503–7509 (2007).

Li X.C.; Rothstein D.M.; Sayegh M.H: Costimulatory pathways in transplantation: challenges and new developments. *Immunological Reviews* 229:271–293 (2009).

Nagy Z.A: Alloreactivity: an old puzzle revisited. Scandinavian *Journal of Immunology* 75:463–470 (2012).

Nankivell B.J.; Alexander S.I: Rejection of the kidney allograft. *New England Journal of Medicine* 363:1451–1462 (2010).

Wood K.J.; Goto R: Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation* 93:1–10 (2012).

Il trapianto nella pratica clinica

Blazar B.R.; Murphy W.J.; Abedi M M: Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nature Reviews Immunology* 12:443–458 (2012).

Chinen J.; Buckley R.H: Transplantation immunology: solid organ and bone marrow. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125:S324–S335 (2010).

Li H.W.; Sykes M: Emerging concepts in haematopoietic cell transplantation. *Nature Reviews Immunology* 12:403–416 (2012).

McCall M.; Shapiro A.M: Update on islet transplantation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2:a007823 (2012).

Immunosoppressione e induzione della tolleranza agli autotrapianti

Chidgey A.P.; Layton D.; Trounson A.; Boyd R.L: Tolerance strategies for stem-cell-based therapies. *Nature* 453:330–377 (2008).

Halloran P.F: Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *New England Journal of Medicine* 351:2715–2729 (2004).

Safinia N.; Sagoo P.; Lechler R.; Lombardi G: Adoptive regulatory T cell therapy: challenges in clinical transplantation. *Current Opinions in Organ Transplantation* 15:427–434 (2010).

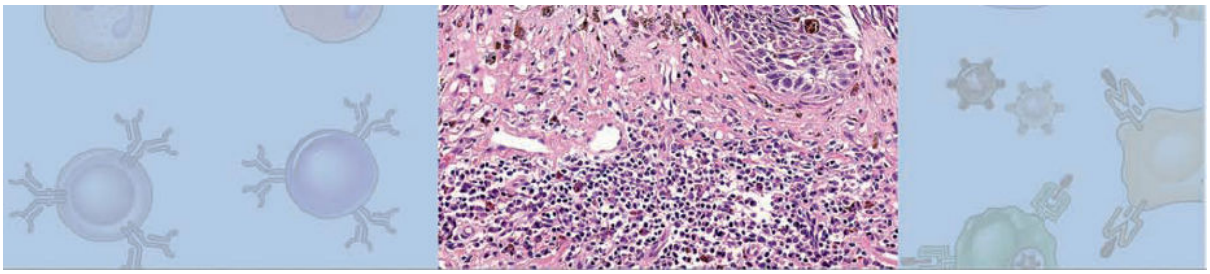
Turka L.A.; Lechler R.I: Towards the identification of biomarkers of transplantation tolerance. *Nature Reviews Immunology* 9:521–526 (2009).

Xenotrapianti

Yang Y.G.; Sykes M: Xenotransplantation: current status and a perspective on the future. *Nature Reviews Immunology* 7:519–531 (2007).

CAPITOLO

18



Immunità e tumori

CARATTERISTICHE GENERALI DELL'IMMUNITÀ ANTITUMORALE

ANTIGENI TUMORALI

- Prodotti dei geni mutati
- Proteine espresse in modo anomalo ma prive di mutazioni
- Antigeni prodotti da virus oncogeni
- Antigeni oncofetali
- Antigeni costituiti da glicolipidi e glicoproteine alterati
- Antigeni di differenziazione tissutale

RISPOSTE IMMUNITARIE AI TUMORI

- Linfociti T
- Anticorpi
- Cellule natural killer (NK)
- Macrofagi

ELUSIONE DELLE RISPOSTE IMMUNITARIE DA PARTE DEI TUMORI

- Elusione del riconoscimento da parte del sistema immunitario per la mancata espressione degli antigeni
- Inibizione attiva delle risposte immunitarie

IMMUNOTERAPIA DEI TUMORI

- Stimolazione della risposta immunitaria dell'ospite
- Immunoterapia passiva con linfociti T e anticorpi

RUOLO DELL'IMMUNITÀ INNATA E ADATTIVA NELLA PROGRESSIONE TUMORALE

RIEPILOGO

I tumori maligni rappresentano un problema prioritario per la salute della popolazione mondiale, essendo una tra le più importanti cause di morbilità e mortalità nel bambino e nell'adulto. La pericolosità dei tumori maligni è dovuta alla crescita incontrollata e al danno e deficit funzionale del tessuto. La malignità del tumore riflette il deficit di regolazione della proliferazione cellulare, la resistenza delle cellule tumorali alla morte per apoptosi, la loro capacità di invadere i tessuti dell'ospite e formare metastasi a distanza, nonché i meccanismi di elusione delle difese immunitarie. L'idea che sia possibile eradicare i tumori tramite risposte immunitarie specifiche è alla base della grande mole di lavoro effettuata nel campo dell'immunologia dei tumori. Il concetto di **immunosorveglianza**, proposto da Macfarlane Burnet negli anni Cinquanta del Novecento, stabilisce che tra le funzioni fisiologiche del sistema

immunitario vi sono il riconoscimento e l'eliminazione di cloni di cellule trasformate, prima che questi diano origine a un tumore, e l'eliminazione dei tumori stessi dopo la loro formazione. L'importanza e l'esistenza stessa dell'immunosorveglianza sono state messe in discussione dai risultati di alcuni esperimenti e il suo ruolo può in effetti variare nei confronti dei diversi tipi di tumore. Oggi appare tuttavia evidente che sia il sistema immunitario innato sia quello adattativo sono in grado di reagire nei confronti di molte neoplasie e la possibilità di utilizzare tali reazioni per eliminare i tumori con modalità specifiche resta un obiettivo importante degli immunologi. In questo capitolo descriveremo i tipi di antigeni espressi dai tumori maligni, il modo in cui il sistema immunitario riconosce e risponde a questi antigeni, come i tumori eludono il riconoscimento da parte del sistema immunitario dell'ospite e gli approcci usati nell'immunoterapia dei tumori.

CARATTERISTICHE GENERALI DELL'IMMUNITÀ ANTITUMORALE

Le diverse caratteristiche degli antigeni tumorali e delle risposte immunitarie verso i tumori sono fondamentali sia per la comprensione dell'immunità antitumorale sia per lo sviluppo di strategie di immunoterapia.

- ***I tumori stimolano risposte immunitarie adattative.*** Osservazioni cliniche e studi sperimentali hanno indicato che, sebbene le cellule tumorali derivino da cellule dell'organismo ospite, i tumori stimolano le risposte immunitarie. Studi istopatologici mostrano che molti tumori sono infiltrati da cellule mononucleate come i linfociti T, le cellule natural killer (NK) e i macrofagi e che linfociti attivati e macrofagi sono presenti nei linfonodi drenanti la sede della crescita tumorale (Fig. 18-1). La presenza di infiltrati linfocitari in alcuni tipi di tumori, come il melanoma, il carcinoma mammario e il tumore del colon, è predittiva di una prognosi migliore. La prima dimostrazione sperimentale che i tumori possono indurre risposte immunitarie protettive deriva da esperimenti condotti negli anni Cinquanta (Fig. 18-2). Se si applica sulla cute di un topo inbred il carcinogeno chimico metilcolantrene (MCA) si può indurre la formazione di un sarcoma. Se il tumore indotto da MCA viene rimosso e

trapiantato in altri topi singenici, esso continua a crescere. Al contrario, se le cellule prelevate dal tumore originale vengono nuovamente trapiantate nel topi in cui il tumore era originato, il topo le rigetta e il tumore non si sviluppa. Lo stesso topo che è diventato immune al proprio tumore non è però in grado di rigettare sarcomi indotti con MCA in altri topi. I linfociti T dell'animale in cui si è sviluppato il tumore possono trasferire un'immunità protettiva nei confronti di quel tumore a un animale privo di tumore. Pertanto, le risposte immunitarie verso i tumori presentano le caratteristiche distintive dell'immunità adattativa, cioè specificità e memoria, e sono mediate dai linfociti. Come indicato dagli esperimenti sopra citati, la risposta più efficace contro i tumori che insorgono spontaneamente sembra dovuta principalmente ai linfociti T.

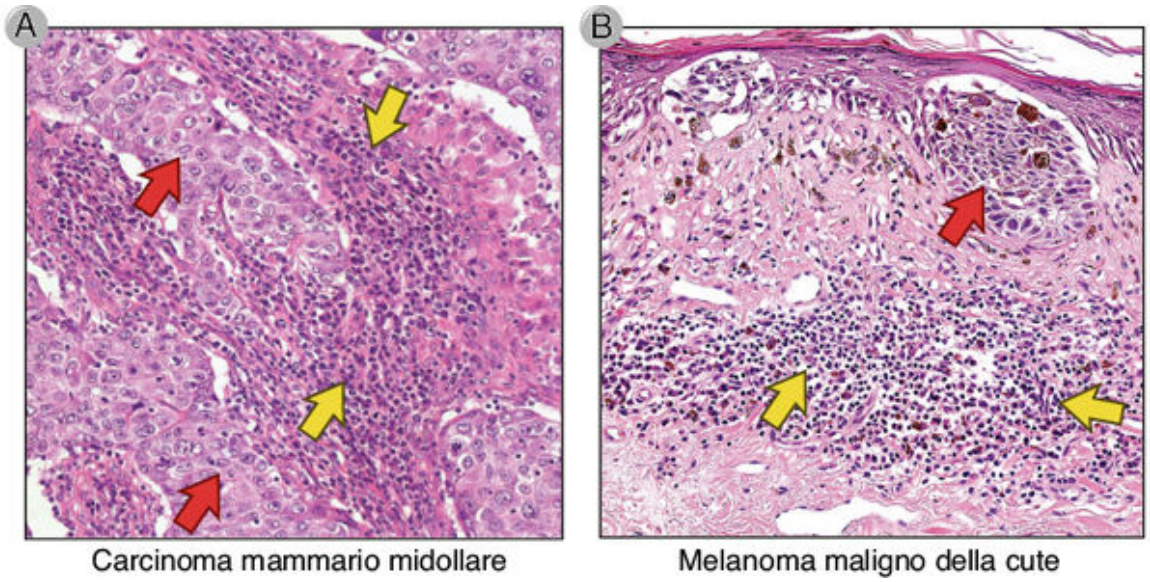


FIGURA 18-1 Infiltrato infiammatorio associato ad alcuni tumori. A. Carcinoma mammario midollare. **B.** Melanoma maligno. Le *frecce rosse* indicano le cellule neoplastiche, quelle *gialle* indicano gli infiltrati infiammatori ricchi in linfociti.

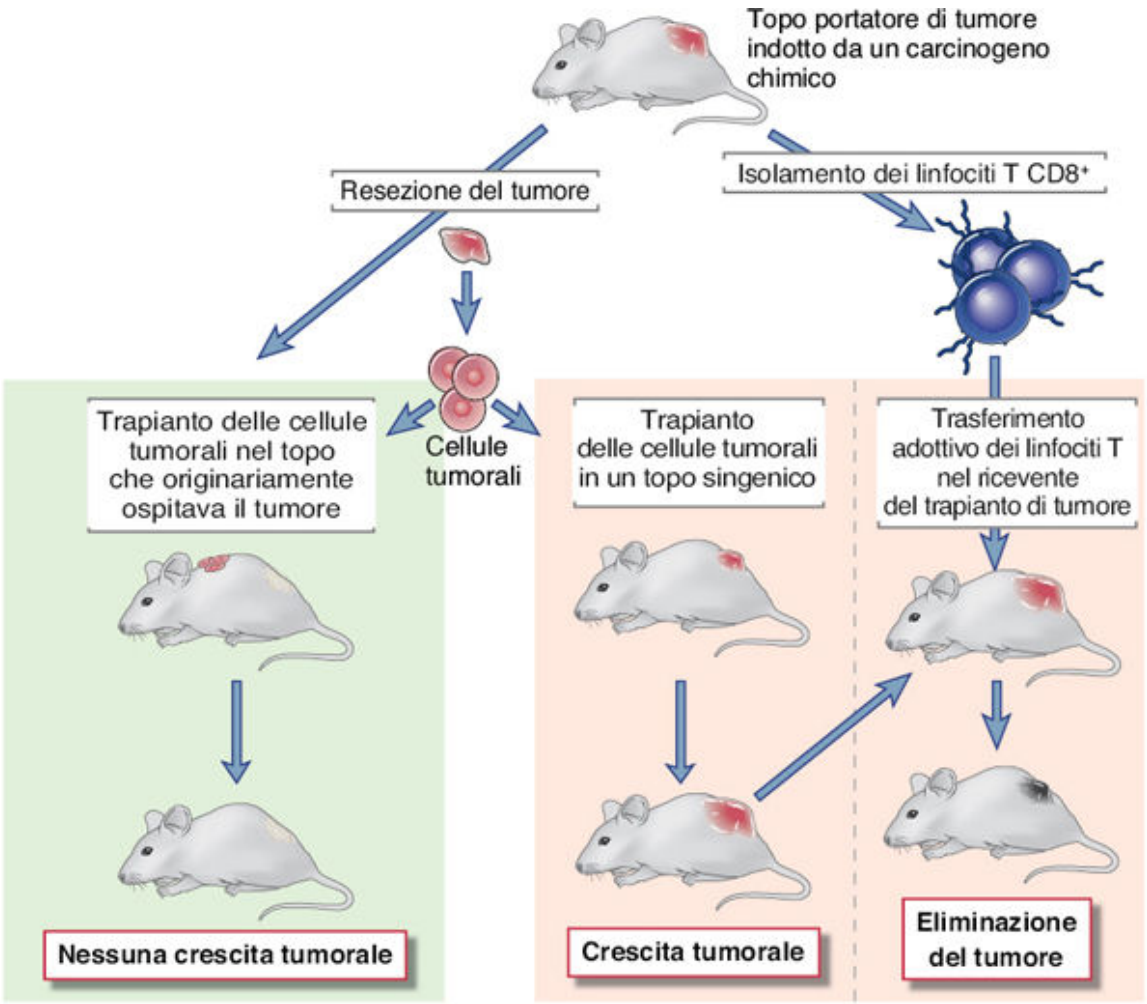


FIGURA 18-2 Dimostrazione sperimentale dell'esistenza dell'immunità antitumorale. I topi a cui è stato chirurgicamente rimosso un tumore indotto con un carcinogeno chimico (metilcolantrene) rigettano i successivi trapianti dello stesso tumore, mentre il tumore trapiantato cresce nel topo singenico. Il tumore viene rigettato anche in altri topi singenici in seguito al trasferimento adottivo di linfociti T dell'animale che originariamente ospitava il tumore.

- ***Le risposte immunitarie spesso non riescono a prevenire lo sviluppo di tumori.*** Possono esservi molteplici ragioni per cui l'immunità antitumorale risulta incapace di eradicare le cellule trasformate. In primo luogo, molti tumori possiedono meccanismi specializzati per eludere le risposte dell'ospite. Torneremo su questi meccanismi più avanti nel capitolo. In secondo luogo, le cellule tumorali derivano dalle cellule dell'ospite e pertanto assomigliano molto alle cellule normali; molti tumori tendono quindi a essere solo debolmente immunogenici. I tumori che evocano forti risposte immunitarie sono quelli generati dai virus oncogeni, in cui le proteine virali si comportano da antigeni estranei.

Molti tumori spontanei inducono una risposta immunitaria debole o quasi nulla, e ciò può essere dovuto al fatto che i tumori in fase di sviluppo vanno incontro a mutazioni che riducono la loro capacità di stimolare una forte risposta immunitaria. Quindi, è oggi chiaro che l'importanza dell'immunosorveglianza e dell'immunità antitumorale varia con il tipo di tumore. In terzo luogo, la rapida crescita e la diffusione del tumore possono prevalere sulla capacità del sistema immunitario di controllare le cellule tumorali, cioè di eliminare tutte le cellule maligne.

- ***Il sistema immunitario può essere attivato per uccidere efficacemente le cellule tumorali ed eliminare la neoplasia.*** Come si vedrà al termine di questo capitolo, questa osservazione ha prodotto nuovi approcci nell'ambito dell'immunoterapia dei tumori, con l'obiettivo di potenziare le risposte antitumorali dell'ospite.

L'esistenza dell'immunità antitumorale specifica indica che i tumori esprimono antigeni che sono riconosciuti come estranei dall'ospite. Di seguito descriveremo la natura e il significato di questi antigeni.

ANTIGENI TUMORALI

La prima classificazione degli antigeni tumorali si basava sul loro profilo di espressione. Gli antigeni espressi in modo selettivo dalle cellule tumorali sono denominati **antigeni tumore-specifici**; alcuni di questi sono caratteristici di un singolo tumore, mentre altri sono condivisi da tumori dello stesso tipo. Gli antigeni tumorali espressi anche dalle cellule normali sono invece chiamati **antigeni tumore-associati**; nella maggioranza dei casi, questi antigeni sono normali costituenti cellulari la cui espressione è aberrante o sregolata nei tumori. La moderna classificazione degli antigeni tumorali si basa sulla struttura molecolare e sull'origine degli antigeni.

Per identificare gli antigeni tumorali sono stati utilizzati vari approcci di tipo biochimico e di genetica molecolare. Nel caso degli antigeni tumorali riconosciuti dai linfociti T citotossici (*Cytotoxic T Lynphocytes*, CTL), i ricercatori hanno utilizzato cloni di CTL specifici per il tumore derivati da pazienti oncologici. Questi cloni sono stati impiegati per identificare il peptide antigenico rilevante o il gene che codifica per tale antigene. Questi cloni di CTL specifici per l'antigene tumorale sono in grado di identificare peptidi

derivati da proteine tumorali o proteine sintetizzate a partire dal DNA complementare (cDNA) di librerie tumorali. Questi approcci sono stati inizialmente impiegati per identificare gli antigeni del melanoma umano che stimolano risposte di tipo CTL in pazienti affetti da questa neoplasia. Le stesse metodiche sono state poi estese all'identificazione di antigeni riconosciuti da cloni T helper $CD4^+$ autologhi derivati da pazienti.

Una tecnologia per l'identificazione di antigeni tumorali è definita SEREX (*SErologic analysis of REcombinant complementary DNA eXpression*). Secondo questa metodica, le librerie di espressione del cDNA generato dall'RNA tumorale di un paziente vengono transfettate in una linea cellulare e vengono eseguiti dei saggi per rilevare il legame delle immunoglobuline, presenti nel siero del paziente oncologico, sulla superficie delle cellule transfettate. Questo approccio permette di identificare le sequenze geniche delle proteine che hanno stimolato le risposte anticorpali nei pazienti.

Nel paragrafo che segue, descriveremo le principali classi di antigeni tumorali (Tab. 18-1). Sono inclusi antigeni tumorali noti per indurre risposte immunitarie in pazienti portatori di neoplasia, così come antigeni associati al tumore, che possono non indurre naturalmente le risposte immunitarie dell'ospite ma sono bersagli potenziali per l'immunoterapia o marcatori utili per la diagnosi e il monitoraggio dei pazienti.

TABELLA 18-1 Antigeni tumorali

Tipo di antigene	Esempi di antigeni tumorali nell'uomo
Prodotti di oncogeni e di geni oncosoppressori	Prodotti degli oncogeni: mutazioni di Ras (~10% dei carcinomi umani), p210 prodotto dei riarrangiamenti di Bcr/Abl (CML) Prodotti dei geni oncosoppressori: p53 mutata (presente nel ~50% dei tumori umani)
Prodotti di oncogeni iperespressi ma privi di mutazione	HER2/Neu (carcinoma della mammella e altri carcinomi)
Mutazione di geni non coinvolti nella tumorigenesi	Varie proteine mutate in melanomi riconosciuti dai linfociti T citotossici
Prodotti di geni che sono silenti nella maggior parte dei tessuti normali	Antigeni tumorali/testicolari espressi nei melanomi e in molti carcinomi; espressi normalmente soprattutto nella placenta e nel testicolo
Proteine normali non oncogeniche iperespresse nelle cellule tumorali	Tirosinasi, gp100, MART nei melanomi (espressi normalmente nei melanociti)
Prodotti di virus oncogeni	Proteine E6 ed E7 del papillomavirus (carcinoma della cervice)

	Proteina EBNA-1 dell'EBV (linfomi EBV-associati, carcinoma nasofaringeo)
Antigeni oncofetali	Antigene carcino-embrionale espresso in molti tumori, ma presente anche nel fegato e in altri tessuti durante un'infiammazione α-fetoproteina
Glicolipidi e glicoproteine	GM_2, e GD_2 nei melanomi
Antigeni di differenziazione presenti normalmente nei tessuti di origine	Antigene prostatico specifico nei carcinomi della prostata CD20 nei linfomi a cellule B
CML (*Chronic Myelogenous Leukemia*), leucemia mieloide cronica; EBNA (*Ebstein-Barr Nuclear Antigen*), antigene nucleare del virus di Epstein-Barr; EBV (*Ebstein-Barr Virus*), virus di Epstein-Barr; MART (*Melanoma Antigen Recognized T cells*), antigene del melanoma riconosciuto dai linfociti T.	

Prodotti dei geni mutati

Gli oncogeni e i geni oncosoppressori mutati producono proteine che differiscono dalle normali proteine cellulari e, pertanto, possono indurre una risposta immunitaria. Molte neoplasie esprimono geni i cui prodotti sono necessari per la trasformazione maligna o per il mantenimento del fenotipo maligno della cellula tumorale. Spesso, questi geni sono prodotti da mutazioni puntiformi, delezioni, traslocazioni cromosomiche o inserzioni di geni virali a carico di protoncogeni o geni oncosoppressori, che producono proteine citosoliche o nucleari degradate nel proteosoma e che possono essere presentate sulle molecole MHC di classe I delle cellule tumorali. Tali proteine possono seguire la via di presentazione dell'antigene delle molecole MHC di classe I e II nelle cellule dendritiche che hanno fagocitato cellule tumorali morte o corpi apopototici derivati dalle cellule tumorali. I prodotti di tali geni mutati sono assenti nelle cellule normali e per questo non inducono tolleranza e i peptidi da essi codificati possono stimolare le risposte T nell'ospite. Alcuni pazienti oncologici presentano in circolo linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$ in grado di rispondere ai peptidi codificati dagli oncogeni mutati, per esempio da *RAS*, o ai peptidi nuovi derivati dalla fusione di proteine come Bcr/Abl generate dalle traslocazioni cromosomiche presenti nel tumore, nonché specifici per i peptidi prodotti da oncosoppressori mutati come *p53*. Inoltre, negli animali, la vaccinazione con le proteine Ras o p53 mutate induce la generazione di CTL specifici e determina il rigetto dei tumori che esprimono tali mutanti. Non sembra tuttavia che, nella maggior parte dei pazienti, tali proteine siano i principali bersagli dei CTL tumore-specifici.

Gli antigeni tumorali possono essere prodotti da geni mutati casualmente i cui prodotti non sono correlati al fenotipo trasformato. Gli antigeni tumorali identificati in modelli murini di trapianto di tumori indotti da cancerogeni chimici, denominati *antigeni tumore-specifici da trapianto*, sono forme mutate di proteine dell'ospite. Studi su sarcomi indotti chimicamente nei roditori, come quelli illustrati nella Figura 18-2, hanno indicato che tumori diversi, tutti indotti dallo stesso cancerogeno, esprimono antigeni diversi. Gli antigeni tumorali identificati in simili esperimenti sono costituiti da peptidi derivati da proteine self mutate presentate su molecole MHC di classe I, in grado di stimolare i CTL. Questi antigeni sono estremamente diversificati perché gli agenti cancerogeni possono indurre mutazioni casuali virtualmente in ogni gene del ricevente e la via di presentazione su MHC di classe I può utilizzare peptidi provenienti da qualsiasi proteina citosolica mutata in ciascun tumore. Più di recente, il sequenziamento dei geni dei tumori più comuni dell'uomo ha messo in evidenza che molti di essi presentano un numero elevato di mutazioni tumore-specifiche, la maggior parte delle quali coinvolge geni che non si credevano correlati allo sviluppo del fenotipo maligno del tumore. Le proteine mutate possono operare quali antigeni tumorali nel caso siano in grado di produrre peptidi che si legano agli alleli delle molecole MHC dell'individuo affetto. Di recente, grazie all'approccio di "Next Generation Sequencing" è stato possibile comparare le cellule tumorali e le rispettive cellule normali dello stesso individuo e identificare i peptidi tumore-specifici.

Proteine espresse in modo anomalo ma prive di mutazioni

Gli antigeni tumorali in grado di scatenare risposte immunitarie possono essere costituiti da proteine normali espresse in modo anomalo dalle cellule tumorali. Molti di questi antigeni sono stati identificati in tumori umani, come i melanomi, mediante il clonaggio molecolare degli antigeni riconosciuti dai linfociti T isolati da pazienti. Da questi studi è inaspettatamente emerso che alcuni antigeni tumorali sono proteine non mutate, che però in condizioni normali vengono espresse a bassi livelli, mentre sono espresse in modo anomalo in quelle tumorali. Uno di questi antigeni è la *tirosinasi*, un enzima implicato nella biosintesi della melanina, espresso nei melanociti normali e nei melanomi. Cloni di linfociti T $CD8^+$ ristretti per MHC di classe I e $CD4^+$ ristretti per MHC di classe II ottenuti da pazienti con melanoma riconoscono peptidi che derivano dalla tirosinasi. È abbastanza sorprendente che i linfociti

di questi pazienti siano in grado di rispondere a un antigene self normale. La spiegazione più probabile è che la tirosinasi venga prodotta normalmente in quantità talmente piccole e da così poche cellule da non essere riconosciuta dal sistema immunitario e da non indurre tolleranza. Perciò, l'aumentata quantità, prodotta dalle cellule di melanoma, è in grado di suscitare una risposta da parte del sistema immunitario. La scoperta di risposte specifiche dei linfociti T verso la tirosinasi lascia ipotizzare che vaccini che includano i peptidi derivanti dalla tirosinasi possano stimolare tali risposte nei pazienti con melanoma; sono attualmente in corso studi clinici con questi vaccini.

Gli antigeni tumorali/testicolari sono proteine espresse nel gamete e nel trofoblasto, oltre che in numerosi tipi di tumori, ma mai nelle cellule somatiche normali. Il primo di questi antigeni fu identificato durante il clonaggio dei geni che codificano per antigeni proteici del melanoma che venivano riconosciute in modo specifico da CTL isolati dagli stessi pazienti oncologici. Questi antigeni vennero chiamati MAGE e furono successivamente identificati anche in altri tipi di tumore oltre ai melanomi, compresi i carcinomi della vescica, della mammella, della cute, del polmone e della prostata, e ad alcuni sarcomi, nonché nei testicoli normali. In seguito a questa scoperta, furono identificate molte altre famiglie di geni che codificano per proteine riconosciute dai CTL presenti nei pazienti con melanoma. Analogamente alle proteine MAGE, questi geni sono normalmente silenti nella maggior parte dei tessuti normali, con l'eccezione del testicolo e dei trofoblasti della placenta, ma sono espressi da molteplici tumori. Sono state identificate più di 40 diverse famiglie di antigeni tumorali/testicolari, circa la metà delle quali è codificata da geni presenti sul cromosoma X, mentre la restante parte è codificata da geni variamente distribuiti nell'intero genoma. È noto che alcuni di questi antigeni sono in grado di regolare la trascrizione/traduzione di altri geni, ma la funzione della maggior parte di queste proteine non è ancora conosciuta. In generale, gli antigeni tumorali/testicolari non sono indispensabili per l'induzione del fenotipo maligno delle cellule tumorali e la loro sequenza è identica a quella dei corrispondenti geni espressi in cellule normali, a indicare che non derivano da geni mutati. Molti antigeni tumorali legati al cromosoma X sono attualmente oggetto di sperimentazione clinica come vaccini tumorali.

Antigeni prodotti da virus oncogeni

I prodotti dei virus oncogeni si comportano da antigeni tumorali ed evocano risposte specifiche T che possono servire a eliminare i tumori. I virus a DNA sono implicati nello sviluppo di una serie di tumori nell'uomo e negli animali. Esempi che riguardano l'uomo comprendono il virus di Epstein-Barr (*Epstein-Barr Virus*, EBV), associato a linfomi a cellule B e al carcinoma nasofaringeo, e il papillomavirus umano (*Human Papilloma Virus*, HPV), associato a carcinomi della cervice uterina, dell'orofaringe e di altri siti, nonché a herpesvirus associato a sarcoma di Kaposi (KSHV/HHV-8), a sua volta legato a tumori vascolari. I papovavirus, compresi il poliomavirus e il virus simian 40 (*Simian vacuolating Virus 40*, SV40), e gli adenovirus inducono tumori maligni nei roditori neonati e negli animali adulti immunodeficienti. Nella maggioranza di questi tumori, le proteine antigeniche codificate dal virus sono rintracciabili nel nucleo, nel citoplasma o nella membrana plasmatica delle cellule tumorali. Queste proteine virali sintetizzate a livello endogeno possono essere processate e presentate da molecole MHC di classe I sulla superficie della cellula tumorale. Poiché i peptidi virali sono antigeni esogeni, i tumori indotti da virus a DNA sono tra quelli maggiormente immunogenici.

La capacità dell'immunità specifica di prevenire lo sviluppo di tumori indotti dai virus a DNA è stata confermata da molte osservazioni cliniche e sperimentali. Per esempio, i linfomi associati all'EBV e le neoplasie della cervice uterina associate all'HPV insorgono più frequentemente in individui immunodepressi, come i soggetti che ricevono allotrapianti e vengono sottoposti a terapia immunosoppressiva e i pazienti con sindrome da immunodeficienza acquisita, mentre il sarcoma di Kaposi si registra più comunemente nei pazienti con AIDS. Gli esperimenti di trapianto di tumore come quelli illustrati nella Figura 18-2 hanno dimostrato la capacità di rigettare i tumori indotti da virus a DNA da parte di topi precedentemente immunizzati con lo stesso tumore. A differenza degli antigeni tumorali indotti da MCA, che sono il prodotto di geni cellulari casualmente mutati, gli antigeni tumorali codificati dai virus sono condivisi da tutti i tumori indotti dallo stesso tipo di virus.

La comprensione che le risposte immunitarie verso i virus proteggono gli individui dalle neoplasie causate dai virus stessi ha portato allo sviluppo di vaccini contro i virus oncogeni. Per esempio, attualmente è in uso un vaccino contro l'HPV per le donne e per gli uomini, che riduce l'incidenza delle lesioni pre-cancerose della cervice uterina nella donna vaccinata. Questo vaccino è composto da proteine ricombinanti del capside dell'HPV, condivise dalla

maggior parte dei ceppi oncogeni di HPV, che formano particelle simili al virus prive del genoma virale. La vaccinazione contro il virus dell'epatite B è in grado di ridurre l'incidenza dei tumori al fegato. In questo caso il virus non è oncogeno, ma è in grado di promuovere lo sviluppo del tumore al fegato probabilmente causando un'infiammazione cronica, che è un fattore di rischio per lo sviluppo dei tumori (se ne parlerà più avanti in questo capitolo).

I virus oncogeni a RNA (retrovirus) sono importanti cause di tumore nell'animale. I prodotti degli oncogeni retrovirali hanno teoricamente lo stesso potenziale antigenico degli oncogeni cellulari mutati e si possono osservare sperimentalmente risposte immunitarie umorali e cellulari verso i prodotti retrovirali espressi dalle cellule tumorali. L'unico retrovirus umano oncogeno ben caratterizzato è il virus T-linfotropico umano di tipo I (*Human T cell Lymphotropic Virus-1*, HTLV-1), l'agente eziologico della leucemia/linfoma a cellule T dell'adulto, un tumore maligno dei linfociti T $CD4^+$. Sebbene negli individui infettati da questo virus sia stata dimostrata un'attivazione dell'immunità specifica verso gli antigeni codificati dall'HTLV-1, non è chiaro se questa abbia un ruolo protettivo contro lo sviluppo del tumore. Inoltre, i pazienti con leucemia/linfoma a cellule T dell'adulto presentano spesso un elevato grado di immunosoppressione, probabilmente dovuto all'infezione e alle alterazioni funzionali dei linfociti T $CD4^+$ indotte dal virus.

Antigeni oncofetali

Gli antigeni oncofetali sono proteine espresse a elevati livelli dalle cellule neoplastiche e dai tessuti fetali normali in via di sviluppo, ma non dai tessuti adulti. Si ritiene che i geni che codificano per queste proteine vengano repressi durante lo sviluppo e siano derepressi nel corso della trasformazione maligna. Gli antigeni oncofetali sono stati identificati con anticorpi ottenuti in specie diverse dall'uomo e la loro principale importanza sta nella possibilità di utilizzarli come marcatori per supportare la diagnosi di neoplasia. Tuttavia, la loro espressione negli adulti non è limitata ai tumori ma risulta aumentata nei tessuti e in circolo durante varie condizioni infiammatorie e gli antigeni sono stati trovati in piccole quantità persino in tessuti normali. Non esistono prove che gli antigeni oncofetali si comportino come induttori o bersagli dell'immunità antitumorale. I due antigeni oncofetali meglio caratterizzati sono l'*antigene carcinoembrionale* (*CarcinoEmbryonic Antigen*, CEA) e l'*α-fetoproteina* (AFP).

CEA (CD66) è una proteina integrale di membrana altamente glicosilata, membro della superfamiglia delle immunoglobuline (Ig). È una molecola di adesione intercellulare che promuove il legame reciproco delle cellule tumorali. Un'alta espressione di CEA è normalmente limitata alle cellule dell'intestino, del pancreas e del fegato durante i primi due trimestri della gravidanza e una bassa espressione è osservata nella mammella durante l'allattamento e nella mucosa normale del colon dell'adulto. L'espressione di CEA è aumentata in molti carcinomi del colon, del pancreas, dello stomaco e della mammella, con un corrispondente aumento dei livelli sierici. Il livello sierico di questo antigene è impiegato per monitorare la persistenza o l'insorgenza di recidive delle neoplasie dopo il trattamento, ma non si tratta di un marcatore diagnostico in quanto i suoi livelli sierici possono essere elevati anche in affezioni non neoplastiche, come le condizioni infiammatorie croniche dell'intestino o del fegato.

AFP è una glicoproteina circolante, normalmente sintetizzata e secreta durante la vita fetale dal sacco vitellino e dal fegato. Le concentrazioni nel siero fetale possono arrivare fino a 2-3 mg/ml, ma nella vita adulta la proteina è sostituita dall'albumina e nel siero sono dosabili soltanto bassi livelli. I livelli sierici di AFP possono essere significativamente elevati nei pazienti con carcinoma epatocellulare, tumori a cellule germinali e, occasionalmente, tumori gastrici e pancreatici. Un elevato livello sierico di AFP è un indicatore della presenza di tumori del fegato o delle cellule germinali oppure delle recidive di questi dopo il trattamento. Inoltre, l'identificazione di AFP in sezioni tissutali mediante tecniche immunoistochimiche può contribuire all'identificazione delle cellule tumorali. Come per il CEA, il valore diagnostico dei livelli sierici di AFP è limitato dal fatto che elevati livelli sierici sono stati riscontrati anche in affezioni non neoplastiche, come la cirrosi epatica.

Antigeni costituiti da glicolipidi e glicoproteine alterati

La maggior parte dei tumori umani e sperimentali esprime livelli elevati o forme anomale di glicoproteine e glicolipidi di membrana, che possono fungere da marker diagnostici nonché da bersagli terapeutici. Queste molecole includono gangliosidi, antigeni dei gruppi sanguigni e mucine. Alcuni aspetti del fenotipo maligno dei tumori, inclusi l'invasione tissutale e il comportamento metastatico, possono riflettere alterazioni della superficie

cellulare che derivano da una sintesi anomala di glicolipidi e glicoproteine. Nell'animale, sono stati prodotti molti anticorpi in grado di riconoscere i gruppi carboidrati o i nuclei peptidici di queste molecole. L'espressione della maggior parte di questi epitopi è generalmente aumentata nelle cellule cancerose rispetto a quelle normali, sebbene non sia selettiva per i tumori. Questa classe di antigeni tumore-associati costituisce un bersaglio per la terapia basata sull'impiego di anticorpi monoclonali.

Tra i glicolipidi espressi ad alti livelli nei neuroblastomi, nei melanomi e in molti sarcomi vi sono i gangliosidi GM2, GD2 e GD3. A causa dell'espressione selettiva di queste molecole, essi rappresentano bersagli di interesse per le terapie antitumorali specifiche, come la terapia con anticorpi. Test clinici con anticorpi antiganglioside e l'immunizzazione con vaccini che contengono il ganglioside sono in corso in pazienti affetti da melanoma. Le mucine sono glicoproteine ad alto peso molecolare che contengono numerose catene laterali di carboidrati legati al nucleo polipeptidico. I tumori hanno spesso un'espressione non regolata degli enzimi che sintetizzano queste catene laterali di carboidrati, il che genera la comparsa di epitopi tumore-specifici a livello di tali catene o del nucleo peptidico esposto in modo anomalo. Varie mucine sono state oggetto di studi diagnostici e terapeutici, come CA-125 e CA-19-9, espresse sui carcinomi ovarici, e MUC-1, espressa sui carcinomi mammari e del colon. Diversamente da molte mucine, MUC-1 è una proteina integrale di membrana normalmente espressa solo a livello apicale nell'epitelio duttale mammario, una sede relativamente segregata al sistema immunitario. Nei carcinomi duttali della mammella, tuttavia, la molecola è espressa con modalità non polare e contiene nuovi epitopi glucidici e peptidici tumore-specifici, evidenziabili mediante anticorpi monoclonali murini. Gli epitopi peptidici inducono risposte sia anticorpali sia T nei pazienti affetti da tumore e sono in corso tentativi per sviluppare vaccini che contengano forme immunogeniche di epitopi di MUC-1.

Antigeni di differenziazione tissutale

I tumori possono esprimere molecole che sono normalmente espresse solamente dalle cellule del tessuto da cui il tumore ha avuto origine e non da quelle di altri tessuti. Questi antigeni sono detti *antigeni di differenziazione* poiché sono specifici di particolari stipiti o di alcuni stadi differenziativi di vari tipi cellulari. La loro importanza è quella di costituire potenziali bersagli

per l’immunoterapia e permettere l’identificazione del tessuto di origine dei tumori. Per esempio, molti antigeni del melanoma, che sono bersagli dei CTL nei pazienti tumorali, sono antigeni di differenziazione melanocitaria, come la tirosinasi, già menzionata. I linfomi possono essere caratterizzati come tumori che derivano dai linfociti B, per la presenza di marker di superficie tipici di questo stipite cellulare, come CD10 (precedentemente chiamato antigene comune della leucemia linfoblastica acuta) e CD20. Gli anticorpi contro queste molecole sono anche utilizzati per l’immunoterapia antitumorale; l’immunoterapia di maggior successo per il linfoma a cellule B non-Hodgkin è l’anticorpo anti-CD20 (rituximab). Questi antigeni di differenziazione sono normali molecole self e pertanto non inducono solitamente una forte risposta immunitaria nell’ospite.

RISPOSTE IMMUNITARIE AI TUMORI

È stato dimostrato che le risposte immunitarie adattive, principalmente quelle dei linfociti T, controllano lo sviluppo e la progressione dei tumori maligni. Risposte, sia adattive sia innate, nei confronti del tumore sono riscontrabili nei pazienti e nei modelli animali e studi *in vitro* hanno messo in evidenza diversi meccanismi che possono portare all’uccisione delle cellule tumorali. La sfida per l’immunologia dei tumori è determinare quali meccanismi possano contribuire in maniera significativa alla risposta immunitaria protettiva verso i tumori e potenziarli in modo specifico. In questa parte del capitolo passeremo in rassegna le evidenze relative a vari meccanismi effettori in relazione all’uccisione delle cellule tumorali e descriveremo quelli verosimilmente più importanti per i tumori umani.

Linfociti T

Il principale meccanismo di protezione dell’immunità adattiva nei confronti dei tumori è l’uccisione delle cellule tumorali da parte dei CTL CD8$^+$. La capacità dei CTL di fornire un’immunità antitumorale efficace *in vivo* è chiaramente dimostrabile nell’animale da esperimento utilizzando tumori indotti da cancerogeni chimici e da virus a DNA. Come detto precedentemente, i CTL possono svolgere una funzione di sorveglianza riconoscendo e uccidendo cellule potenzialmente maligne che esprimono

peptidi presentati in associazione a molecole MHC di classe I. I CTL tumore-specifici possono essere isolati nell'animale e nell'uomo portatori di tumore ed è stato dimostrato che nell'uomo la prognosi di alcuni dei tumori più comuni, quali il carcinoma del colon, sia migliore quando è elevato il numero di CTL infiltranti il tumore stesso. Inoltre, le cellule mononucleate presenti nell'infiltrato infiammatorio dei tumori solidi, denominate *linfociti infiltranti i tumori* (*Tumor-Infiltrating Lymphocytes*, TIL), includono CTL in grado di uccidere il tumore dal quale sono stati purificati. È importante notare come l'incapacità di identificare CTL tumore-specifici in alcuni pazienti potrebbe essere dovuta alla capacità del tumore di sfruttare meccanismi di inibizione. Uno dei risultati più eclatanti delle recenti sperimentazioni cliniche è la scoperta che il blocco di questi meccanismi di inibizione permette di rimuovere il "freno" alle risposte immunitarie e favorisce una forte risposta linfocitaria T nei confronti del tumore. Torneremo su questo punto più avanti nel prosieguo del capitolo.

Le risposte T CD8$^+$ specifiche verso gli antigeni tumorali richiedono la cross-presentazione da parte delle cellule dendritiche. La maggior parte delle cellule tumorali non deriva dalle APC e pertanto non esprime le molecole costimolatorie richieste per iniziare le risposte T o le molecole di classe II richieste per stimolare i linfociti T helper che promuovono la differenziazione dei linfociti T CD8$^+$. Una spiegazione plausibile di come le risposte T verso i tumori abbiano inizio è che le cellule tumorali o i loro antigeni siano captati per fagocitosi dalle APC dell'ospite, in particolare dalle cellule dendritiche, e che gli antigeni tumorali vengano processati dalle APC. I peptidi presenti in questi antigeni sono presentati sulle molecole MHC di classe I ai linfociti T CD8$^+$. Le APC esprimono molecole costimolatorie che possono fornire i segnali necessari per la differenziazione delle cellule T CD8$^+$ in CTL. Questa presentazione crociata, o cross-priming, è stata descritta nei precedenti capitoli (vedi Fig. 6-20). Una volta che i CTL effettori sono stati generati, sono in grado di riconoscere e uccidere le cellule tumorali in assenza di costimolazione. Il cross-priming può essere sfruttato coltivando *in vitro* le cellule dendritiche di un paziente affetto da cancro in presenza di cellule o antigeni tumorali prima di utilizzarle come vaccini per stimolare le risposte T.

L'importanza dei linfociti T helper CD4$^+$ nell'immunità antitumorale è meno chiara. I linfociti T CD4$^+$ possono verosimilmente avere un ruolo nelle risposte immunitarie antitumorali fornendo le citochine necessarie per la

differenziazione dei linfociti T $CD8^+$ naïve in CTL effettori e della memoria (vedi Cap. 11). Inoltre, i linfociti T helper specifici per gli antigeni tumorali liberano citochine, come il TNF e l'IFN-γ, in grado di aumentare l'espressione delle molecole MHC di classe I e la sensibilità alla lisi mediata dai CTL. L'IFN-γ può anche attivare i macrofagi affinché uccidano le cellule tumorali. La sua importanza nell'immunità antitumorale è dimostrata dall'aumentata incidenza di tumori nei topi che sono difettivi per questa citochina, per il suo recettore o per i componenti della trasduzione del segnale del recettore stesso.

Anticorpi

I soggetti portatori di tumore possono produrre anticorpi contro gli antigeni tumorali. Per esempio, i pazienti con linfomi associati a EBV possiedono anticorpi sierici verso gli antigeni codificati dall'EBV espressi sulla superficie delle cellule linfomatose. Gli anticorpi possono uccidere le cellule tumorali tramite l'attivazione del complemento o la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente, mediata dai macrofagi o dalle cellule NK che possiedono i recettori per l'Fc. Vi sono tuttavia scarsi dati a sostegno di un'efficiente risposta umorale contro i tumori *in vivo*, anche se *in vitro* è stata ampiamente dimostrata la capacità degli anticorpi di eliminare le cellule tumorali. Alcuni anticorpi terapeutici antitumorali che vengono passivamente somministrati ai pazienti verosimilmente funzionano mediante citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente, come sarà spiegato più avanti.

Cellule natural killer (NK)

Le cellule NK possono uccidere molti tipi di cellule tumorali e in particolare quelle che hanno una ridotta espressione di molecole MHC di classe I e che esprimono i ligandi dei propri recettori attivatori. *In vitro,* queste cellule sono in grado di uccidere le cellule infettate da virus e alcune linee tumorali, specialmente quelle che derivano da tumori emopoietici. Le cellule NK rispondono anche all'assenza di molecole MHC di classe I, in quanto vengono a mancare i segnali di tipo inibitorio ad esse diretti (vedi Fig. 4-8). Come vedremo in seguito, alcuni tumori perdono l'espressione delle molecole MHC di classe I, forse come risultato di una selezione operata da parte dei CTL ai danni delle cellule che esprimono molecole MHC di classe I. Tale perdita rende le neoplasie ottimi bersagli delle cellule NK. Alcuni tumori esprimono anche le molecole MIC-A, MIC-B e ULB, che sono ligandi per il recettore

attivatorio NKG2D espresso dalle cellule NK. Inoltre, le cellule NK possono riconoscere e lisare cellule tumorali rivestite da IgG mediante il legame con il recettore Fc (FcγRIII o CD16). L'attività tumoricida delle cellule NK è aumentata da alcune citochine, come l'interferone-γ (IFN-γ), IL-15 e IL-12: gli effetti antitumorali di queste citochine sono, quindi, in parte attribuibili all'attivazione delle cellule NK. Le cellule NK attivate dall'IL-2, denominate LAK (*Lymphokine Activated Killer cells*), si ottengono mediante coltura di linfociti purificati da sangue periferico o linfociti isolati dal tumore in presenza di alte concentrazioni di IL-2. Queste cellule hanno una capacità citotossica maggiore rispetto alle cellule NK non attivate. L'uso delle cellule LAK nell'immunoterapia dei tumori sarà trattato oltre.

L'importanza *in vivo* delle cellule NK nell'immunità antitumorale non è chiara. In alcuni studi, topi con deficit dei linfociti T non presentano un'alta incidenza di tumori spontanei e questo è stato attribuito alla presenza di un numero normale di cellule NK che svolgono la funzione di immunosorveglianza. Sono stati descritti alcuni pazienti con deficit a carico delle cellule NK che presentano un'aumentata incidenza di linfomi associati a infezione da EBV.

Macrofagi

I macrofagi sono in grado sia di inibire sia di promuovere la crescita e la diffusione metastatica del tumore, a seconda del loro stato di attivazione. I macrofagi di tipo M1, o classicamente attivati, trattati nel Capitolo 10, sono in grado di uccidere molti tipi di cellule tumorali. Non è noto in quale modo i macrofagi siano attivati dal tumore. I meccanismi possibili includono il riconoscimento, da parte dei TLR dei macrofagi, di alcuni profili molecolari associati al danno cellulare (DAMP) espressi dalle cellule tumorali morenti e l'attivazione da parte dell'IFN-γ prodotto da linfociti T tumore-specifici. I macrofagi di tipo M1 sono in grado di uccidere le cellule tumorali attraverso gli stessi meccanismi usati per uccidere i microbi. Tra questi, il più importante è la produzione di ossido nitrico (NO), la cui attività citotossica è stata dimostrata sia *in vitro* sia *in vivo* in modelli sperimentali murini. Vi sono prove che alcuni macrofagi con fenotipo M2 contribuiscano alla progressione tumorale. Queste cellule secernono il fattore di crescita vascolare endoteliale (*Vascolar Endothelial Growth Factor*, VEGF), il fattore-β di crescita trasformante (*Transforming Growth Factor-β*, TGF-β) e altri fattori solubili

che promuovono l’angiogenesi tumorale. Il ruolo di queste cellule e di altri componenti della risposta dell’ospite nel favorire la crescita tumorale sarà trattato alla fine del capitolo.

ELUSIONE DELLE RISPOSTE IMMUNITARIE DA PARTE DEI TUMORI

Molti tumori maligni sviluppano meccanismi che permettono loro di eludere le risposte antitumorali dell’ospite oppure di resistervi. Questi meccanismi in generale possono essere divisi tra quelli intrinseci alle cellule tumorali e quelli mediati da altre cellule (Fig. 18-3). Uno dei principali obiettivi dell’immunologia dei tumori è proprio arrivare a comprendere meglio le strategie attraverso cui le cellule tumorali si sottraggono al sistema immunitario, nella speranza di potere intervenire per aumentare l’immunogenicità dei tumori e sfruttare al massimo le risposte antitumorali dell’ospite.

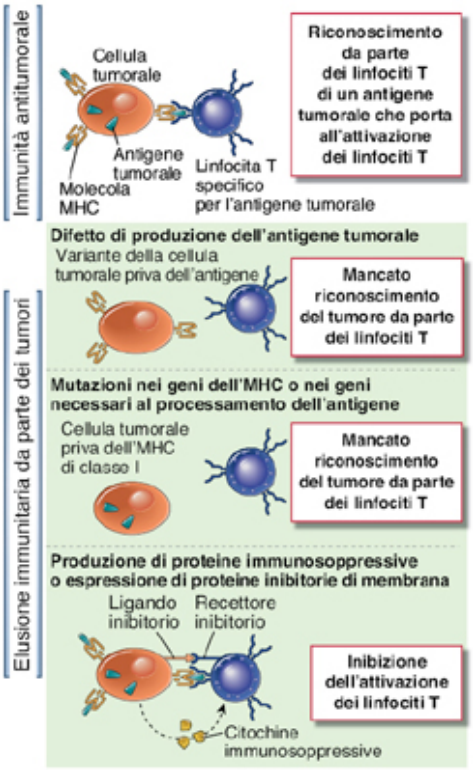


FIGURA 18-3 Meccanismi attraverso cui i tumori sfuggono alle difese immunitarie. L'immunità antitumorale si verifica quando i linfociti Tsi attivano in seguito al riconoscimento degli antigeni tumorali. Le cellule tumorali possono sfuggire alla risposta immunitaria perdendo l'espressione degli antigeni o delle molecole MHC oppure producendo ligandi per i recettori inibitori dei linfociti T o citochine immunosoppressive.

Elusione del riconoscimento da parte del sistema immunitario per la mancata espressione degli antigeni

La risposta immunitaria esercita una pressione selettiva sulle cellule tumorali promuovendo lo sviluppo di varianti dotate di ridotta immunogenicità, secondo un processo chiamato *immunoediting tumorale*. Per esempio, si è osservato che tumori generati da carcinogeni chimici in topi immunodeficienti sono più facilmente rigettati rispetto a quelli ottenuti in topi normali, una volta trapiantati in topi immunocompetenti (Fig. 18-4). Questo risultato indica che il tumore che si sviluppa in un organismo in grado di generare una risposta immunologica antitumorale dà origine a varianti meno immunogeniche. Mutazioni o delezioni a carico dei geni che codificano per gli antigeni tumorali sono frequenti per via dell'elevato tasso di mitosi delle cellule tumorali e della loro instabilità genetica. Se questi antigeni non sono necessari per la crescita delle neoplasie o per il mantenimento del fenotipo trasformato, le cellule tumorali prive di antigeni presentano un vantaggio in termini di crescita rispetto al sistema immunitario dell'ospite. Si pensa, quindi, che i processi di immunoediting tumorale si trovino alla base dello sviluppo di tumori che eludono l'immunosorveglianza.

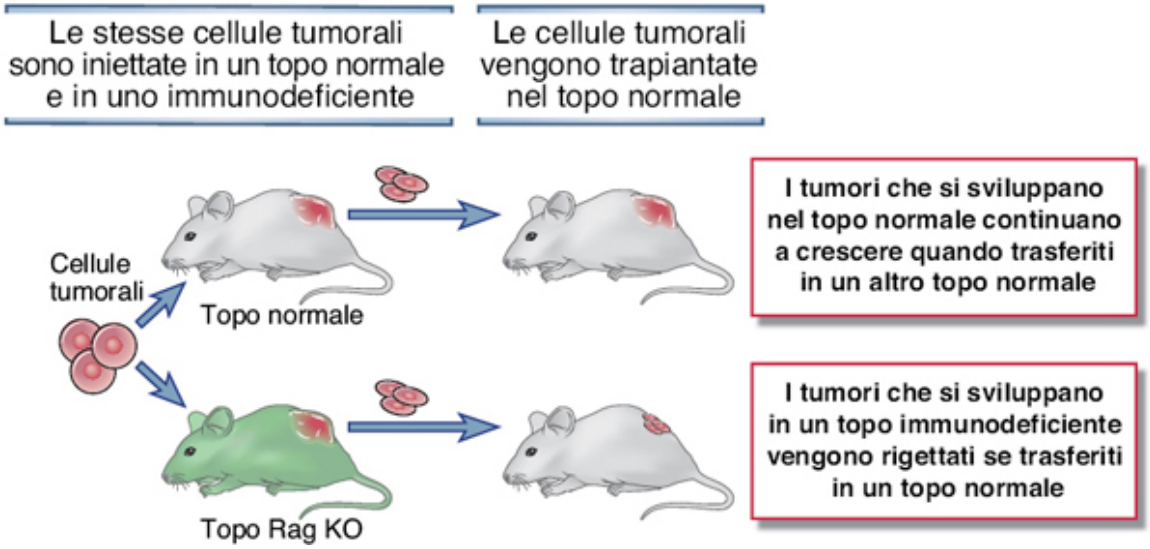


FIGURA 18-4 Immunoediting tumorale. Questo esperimento dimostra che le cellule tumorali che crescono sotto la pressione selettiva del sistema immunitario sono sottoposte a selezione (editing) che produce cellule tumorali in grado di eludere l'immunità. Tali cellule sono in grado di sopravvivere dopo il trasferimento in un secondo ospite. Al contrario, i tumori rimossi da un topo RAG KO, privo dell'immunità adattiva, non sono andati incontro alla stessa pressione selettiva, sono rimasti immunogenici e verranno rigettati dopo il trasferimento in un topo normale.

Oltre alla perdita di antigeni tumore-specifici, le cellule tumorali possono diminuire l'espressione di molecole MHC di classe I in modo da sfuggire al riconoscimento da parte dei CTL. Vari tumori mostrano una ridotta sintesi di molecole MHC di classe I, β_2-microglobulina o di componenti dell'apparato coinvolto nella processazione dell'antigene, tra cui le proteine TAP e alcune subunità del proteasoma. Questi meccanismi sono verosimilmente la conseguenza della pressione selettiva che deriva dalla risposta immunitaria dell'ospite e possono permettere alle cellule tumorali di sfuggire all'azione dei linfociti T. Analisi condotte in un ampio spettro di cellule tumorali sperimentali o umane hanno tuttavia mostrato che non esiste una chiara correlazione tra il livello di espressione delle molecole MHC e la crescita *in vivo* di queste cellule.

Inibizione attiva delle risposte immunitarie

I tumori sono in grado di attivare meccanismi che inibiscono le risposte immunitarie. Vi sono chiare osservazioni cliniche e sperimentali che le risposte dei linfociti T verso alcuni tumori sono inibite dall'azione dei recettori CTLA-4 e PD-1, due delle vie inibitorie meglio conosciute nei linfociti T (vedi Cap. 15). Una possibile spiegazione del ruolo di CTLA-4 in questo contesto è che gli antigeni tumorali vengono presentati dalle APC in assenza di una forte risposta dell'immunità innata, perciò con bassi livelli di espressione delle molecole costimolatorie B7. Questi bassi livelli possono essere sufficienti per legare CTLA-4, che è un recettore ad alta affinità. PD-L1, una proteina della famiglia B7, lega il recettore inibitore PD-1 espresso dai linfociti T (vedi Cap. 15). PD-L1 è espresso da diversi tumori umani e studi condotti nei modelli animali indicano che le risposte T nei confronti delle cellule tumorali sono compromesse dall'espressione di PD-1. PD-L1, quando espresso dalle APC, può inibire l'attivazione dei linfociti T tumore-specifici. Come vedremo più avanti, il blocco di CTLA-4 e della via PD-L1/PD-1 costituisce oggi un metodo utilizzato nella pratica clinica per aumentare le risposte antitumorali.

I prodotti di secrezione delle cellule tumorali possono sopprimere le risposte immunitarie antitumore. Un esempio è il TGF-β, che viene secreto in grandi quantità da molti tumori e inibisce la proliferazione e le funzioni effettrici dei linfociti e dei macrofagi (vedi Cap. 15).

I linfociti T regolatori inibiscono le risposte T verso i tumori. Studi condotti su modelli murini e in pazienti oncologici indicano che nei soggetti portatori di tumore il numero di linfociti T regolatori è aumentato e che queste cellule si localizzano nell'infiltrato leucocitario caratteristico di alcuni tipi di tumori. Nel topo, l'eliminazione dei linfociti T regolatori aumenta la risposta antitumorale con una conseguente riduzione della crescita tumorale.

I macrofagi associati ai tumori possono promuovere la crescita e l'invasività tumorale alterando il microambiente tissutale e sopprimendo le risposte dei linfociti T. Questi macrofagi possiedono un fenotipo di tipo M2, come discusso brevemente in precedenza, e secernono alcuni mediatori, come IL-10 e la prostaglandina E2, che impediscono l'attivazione dei linfociti T e le loro funzioni effettrici. Di contro, i macrofagi associati ai tumori secernono anche dei fattori che promuovono l'angiogenesi, come TGF-β e VEGF, che promuovono la crescita tumorale.

Le cellule soppressorie di derivazione mieloide (*Myeloid-Derived Suppressor Cells, *MDSC) sono precursori mieloidi immaturi che vengono reclutati dal midollo osseo e si accumulano nei tessuti linfoidi, nel sangue o nei tumori dove sopprimono le risposte antitumorali innate e dei linfociti T. Le MDSC, che sono state osservate sia nei modelli animali che nei pazienti tumorali, comprendono una varietà di tipi cellulari, quali i precursori della cellule dendritiche, dei monociti e dei neutrofili. Queste cellule condividono alcuni marcatori comuni di membrana, come Ly6C o Ly6G e CD11b nel topo e CD33, CD11b e CD15 nell'uomo. Il reclutamento delle MDSC dal midollo osseo ai linfonodi o in altri tessuti è causato da vari mediatori proinfiammatori prodotti dal tumore. Questi mediatori, che comprendono la prostaglandina E2, l'IL-6, il VEGF e il frammento C5a del complemento, non sono specifici dei tumori e, in effetti, le MDSC si accumulano anche nei siti di infiammazione cronica non correlati ai tumori. Le MDSC spengono l'immunità innata mediante la secrezione di IL-10, che inibisce varie funzioni infiammatorie dei macrofagi attivati e delle cellule dendritiche. Le MDSC sopprimono inoltre le risposte T mediante diversi meccanismi: generano radicali liberi, come il perossinitrito, che inibiscono l'attivazione dei linfociti T e producono l'indolamina 2,3-diossigenasi, che catabolizza il triptofano, un aminoacido

essenziale per la proliferazione dei linfociti T. Le MDSC alterano indirettamente le risposte T antitumorali inducendo lo sviluppo dei linfociti T regolatori e indirizzando la differenziazione dei linfociti T helper verso cellule T_H2.

IMMUNOTERAPIA DEI TUMORI

La possibilità di curare i pazienti affetti da cancro mediante approcci immunologici ha già da tempo suscitato grandi speranze negli immunologi e negli oncologi. La ragione principale dell'interesse per l'approccio immunologico risiede nel fatto che le terapie attuali si basano su farmaci che eliminano o bloccano le cellule in corso di divisione cellulare e questi trattamenti hanno effetti nocivi sulle cellule proliferanti normali. Ne consegue che il trattamento dei tumori è di per sé causa di morbilità e mortalità. Le risposte immunitarie contro i tumori possono essere indirizzate in modo specifico verso gli antigeni tumorali senza danneggiare le cellule normali. Quindi, l'immunoterapia è potenzialmente il trattamento antitumorale più specifico che possa essere realizzato. I progressi nella comprensione del sistema immunitario e nella caratterizzazione degli antigeni tumorali sono alla base di molte nuove strategie. L'immunoterapia dei tumori mira ad aumentare le risposte del paziente (immunità attiva) o a somministrare anticorpi o linfociti T tumore-specifici (immunità passiva). In questa parte del capitolo, descriveremo alcune forme di immunoterapia sperimentate in passato oppure attualmente in corso di valutazione.

Stimolazione della risposta immunitaria dell'ospite

I primi approcci per incrementare l'immunità antitumorale si basavano sulla stimolazione non specifica del sistema immunitario. Più recentemente, sono stati creati vaccini costituti da cellule tumorali uccise, da antigeni tumorali o da cellule dendritiche incubate con antigeni tumorali. Numerose altre strategie per potenziare la risposta immunitaria contro i tumori sono in fase di sviluppo.

Vaccinazione con antigeni tumorali

L'immunizzazione di pazienti oncologici con gli antigeni tumorali può aumentare la risposta immunitaria nei confronti del tumore. L'identificazione dei peptidi riconosciuti dai CTL tumore-specifici e il clonaggio dei geni che codificano per gli antigeni tumorali ha permesso di ottenere diversi candidati per i vaccini tumorali (Tab. 18-2). In caso di antigeni specifici di singoli tumori, quali gli antigeni prodotti da mutazioni puntiformi casuali a carico dei geni cellulari, si tenta oggi un approccio vaccinale personalizzato. Un approccio che ha mostrato avere un discreto tasso di successo si basa sull'utilizzo di lunghi peptidi immunogenici contenenti mutazioni a carico dei singoli aminoacidi corrispondenti alle mutazioni tumorali, associati ad adiuvanti selezionati.

TABELLA 18-2 Vaccini tumorali

Tipo di antigene	Esempi	Caratteristiche
Prodotti di geni mutati	FNDC3B (per CLL), NeoVax	Epitopi generati da mutazioni somatiche del tumore; assenti nelle cellule normali
Proteine cellulari iperespresse ma non mutate	Gp100, Tirosinasi (melanoma)	Proteine native; in genere iper-espresse nei tumori
Antigeni del tumore e del testicolo	NY-ESO1	Espressione aberrante nelle cellule tumorali; assenti nei tessuti differenziati normali
Cellule tumorali inattivate/cellule tumorali lisate	GVAX, Canavaxin	Complessa miscela di antigeni generata da cellule tumorali autologhe o da linee di cellule tumorali umane
Antigeni associate a HSP	HSPPC-96	Proteine con struttura tridimensionale sbagliata, legate a HSP e destinate alla degradazione da parte del proteasoma
Tumore *in situ*	OncoVAX	Infezione delle cellule tumorali *in situ* con virus oncolitico che dia inizio a una reazione immunitaria che si estende in maniera sistematica

CLL (*Lymphocytic Leukemia*), leucemia linfocitica cronica; HSP (*Heat Shock Protein*), proteina indotta da shock termico.
(*Questa tabella è stata compilata con l'assistenza della Dr.ssa Catherine Wu, Dana-Farber Cancer Institute e Harvard Medical School, Boston, Massachusetts*.)

Le strategie vaccinali antitumorali impiegano diversi adiuvanti e diversi metodi di somministrazione.

- Alcune molecole proinfiammatorie vengono utilizzate per aumentare il numero di cellule dendritiche attivate nel sito della vaccinazione. Questi adiuvanti includono ligandi dei TLR, quali dsRNS, CpG DNA, e BCG, nonché citochine quali GM-CSF e IL-12.
- Gli antigeni tumorali sono somministrati sotto forma di vaccini a cellule dendritiche. Secondo questo approccio, le cellule dendritiche sono prelevate e purificate, incubate con antigeni tumorali e poi iniettate nuovamente al paziente. Attualmente è stato approvato per l'uso clinico un vaccino cellulare per il trattamento del tumore metastatico della prostata, costituito da una preparazione di leucociti prelevati dal sangue periferico del paziente, arricchiti per la presenza di cellule dendritiche e incubate *in vitro* con una proteina di fusione tra il GM-CSF (fattore di stimolazione delle colonie granulocito-macrofagiche; *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) e la fosfatasi acida prostatica, un antigene tumorale. GM-CSF promuove la maturazione delle cellule dendritiche, che presentano l'antigene tumorale e stimolano le risposte dei linfociti T.
- Un approccio alternativo si basa sull'uso di vaccini a DNA e vettori virali codificanti per gli antigeni tumorali: alcuni di questi sono in fase di sperimentazione clinica. Da un punto di vista teorico, i vaccini cellulari e quelli a DNA costituiscono il modo migliore di indurre la risposta dei CTL. Infatti, gli antigeni codificati dai plasmidi e vettori che vengono catturati dalle cellule dendritiche vengono sintetizzati nel citosol e i peptidi processati seguono la via di presentazione delle molecole MHC di classe I.

In generale, i risultati delle sperimentazioni con i diversi tipi di vaccini tumorali sono stati inconsistenti, e ciò probabilmente riflette il fatto che una delle caratteristiche distintive dei tumori è la capacità di eludere l'immunità dell'ospite, spesso inibendo le risposte immunitarie. Inoltre, nella maggior parte dei casi, i vaccini antitumorali sono terapeutici, devono cioè essere somministrati dopo che l'ospite ha sviluppato il tumore (al contrario dei vaccini preventivi usati per le infezioni), quindi l'efficacia dipende dalla loro capacità di superare i meccanismi di inibizione operati dal tumore.

Lo sviluppo di tumori indotti da virus può essere ridotto mediante la vaccinazione preventiva con gli antigeni virali o con virus vivi attenuati. Come già detto, l'introduzione di nuove strategie vaccinali anti-HPV ha causato la

diminuzione dell'incidenza delle lesioni premaligne a carico della cervice uterina. Questo approccio è stato estremamente efficace nel ridurre l'incidenza dei tumori ematologici maligni indotti dal virus della leucemia felina nei gatti e nel prevenire il morbo di Marek, un linfoma causato dall'herpes virus nei polli.

Blocco dei circuiti inibitori per promuovere la risposta antitumorale

Il blocco delle molecole inibitorie dei linfociti T si è imposto come uno dei metodi più promettenti per l'effettivo miglioramento delle risposte immunitarie antitumorali del paziente. Questa strategia terapeutica si basa sull'ipotesi, già discussa in precedenza, che le cellule tumorali utilizzino, per eludere le risposte antitumorali, alcuni dei normali circuiti di regolazione responsabili della tolleranza immunologica. Poiché tali circuiti costituiscono dei checkpoint, ovvero punti di controllo, delle risposte immunitarie, questo tipo di approccio terapeutico viene spesso definito **blocco dei checkpoint**. L'utilizzo di un anticorpo specifico per CTLA-4, il recettore inibitorio delle molecole B7 (vedi Cap. 15), è stato recentemente autorizzato per il trattamento del melanoma in stadio avanzato, e si è rivelato efficace in molti pazienti, rallentando la progressione tumorale. L'efficacia di questo anticorpo potrebbe dipendere non solo dalla sua capacità di bloccare l'azione di CTLA-4 ma forse anche dalla sua capacità di eliminare i linfociti T regolatori che esprimono alti livelli di CTLA-4. Come abbiamo visto in precedenza, le risposte dei linfociti T possono essere inibite anche dall'interazione PD-L1/PD-1 (Fig. 18-5). L'impiego di anticorpi bloccanti, specifici per PD-1 o il suo ligando (PD-L1), è risultato efficace per migliorare l'azione antitumorale dei linfociti T nei modelli murini, e diverse sperimentazioni cliniche sull'uomo hanno confermato che il blocco di PD-1 o di PD-L1 può limitare la progressione del tumore e ridurre il carico tumorale nei pazienti con tumore in stadio avanzato. Le sperimentazioni di una terapia combinata che blocca sia PD-1 sia CTLA-4 si prospettano essere molto efficaci. Alcuni degli effetti indesiderati comunemente associati a questi trattamenti riguardano lo sviluppo di reazioni autoimmuni e infiammatorie, prevedibili alla luce del ruolo svolto da CTLA-4 e PD-1 nel mantenimento della tolleranza al self e nella regolazione delle risposte dei linfociti T. Queste reazioni possono comunque essere tenute sotto controllo con antinfiammatori come i farmaci corticosteroidi. Gli agenti che bloccano i meccanismi inibitori delle risposte immunitarie e, quindi,

aumentano le risposte antitumorali possono essere di massima efficacia in combinazione con i vaccini antitumorali o altri farmaci che agiscono sui processi molecolari che contribuiscono alla crescita tumorale. Una strategia alternativa attualmente in fase di sperimentazione animale consiste nella deplezione dei linfociti T regolatori (*N.d.C.*).

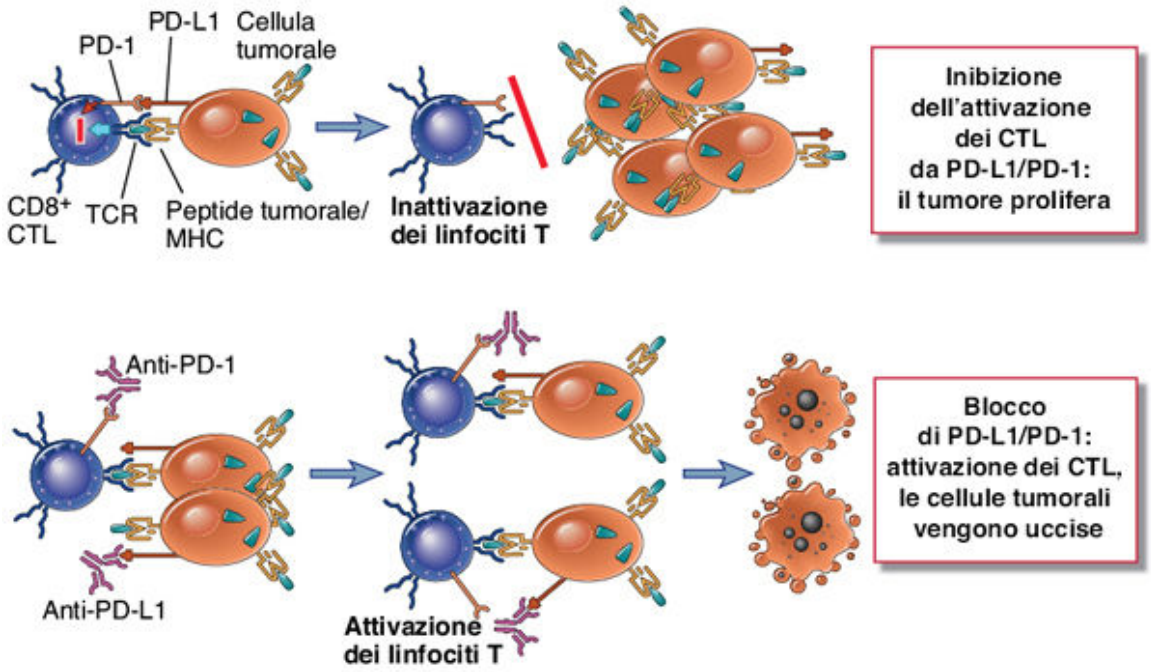


FIGURA 18-5 Blocco delle molecole inibitorie dei linfociti T. I pazienti affetti da tumore spesso presentano risposte dei linfociti T inefficaci nei confronti del tumore a causa dell'iper-espressione di recettori inibitori come PD-1 da parte dei linfociti T tumore-specifici e dell'espressione del ligando PD-L1 da parte delle cellule tumorali. Le sperimentazioni cliniche degli anticorpi bloccanti anti-PD-1 o anti-PD-L1 si sono mostrate efficaci per il trattamento di diversi tipi di tumori in stadio avanzato. Una strategia simile che mira al blocco di CTLA-4 sui linfociti T effettori e sui Treg, attraverso l'utilizzo di anticorpi anti-CTLA-4, è stata approvata per il trattamento del melanoma.

Potenziamento dell'immunità antitumorale dell'ospite con citochine

L'immunità antitumorale cellulo-mediata può essere incrementata trattando i pazienti con citochine che stimolano la proliferazione e la differenziazione dei linfociti T e delle cellule NK. Un approccio potenziale per incrementare la risposta dell'ospite al tumore è di fornire, per via artificiale, citochine in grado di aumentare l'attivazione delle cellule dendritiche e dei linfociti T tumore-specifici, in particolare dei CTL $CD8^+$. Molte citochine sono anche in grado di causare risposte infiammatorie non specifiche, che di per sé possono avere attività antitumorale.

L’esperienza clinica più ampia riguarda la somministrazione di l’IL-2 per via endovenosa che è risultata efficace nell’indurre un’apprezzabile regressione tumorale in circa il 10% dei pazienti con melanoma avanzato o carcinoma renale ed è attualmente una terapia accreditata per queste neoplasie. L’uso di IL-2 ad alto dosaggio, tuttavia, ha dei limiti, poiché stimola la produzione di quantità tossiche di citochine proinfiammatorie quali TNF e IFN-γ, che agendo sull'endotelio vascolare e altre cellule determina una grave sindrome da aumentata permeabilità vascolare.

L’IFN-α è stato approvato per il trattamento del melanoma maligno, in combinazione con la chemioterapia, e per i tumori carcinoidi. Questa citochina è, inoltre, utilizzata per trattare alcune leucemie e alcuni linfomi. I meccanismi responsabili dell’azione antineoplastica dell’IFN-α probabilmente includono l’inibizione della proliferazione delle cellule tumorali, l’aumento dell’attività citotossica delle cellule NK e l’aumento dell’espressione delle molecole MHC di classe I sulle cellule tumorali, che diventano maggiormente suscettibili all’azione citotossica dei CTL.

Altre citochine, come il TNF e l’IFN-γ, sono di per sé efficaci agenti antitumorali nei modelli animali, ma non possono essere somministrati ai pazienti a causa della loro tossicità. I fattori di crescita ematopoietica, tra cui il GM-CSF e il G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*, fattore stimolante le colonie di granulociti;) sono utilizzati di routine nei protocolli antitumorali per ridurre i periodi di neutropenia e trombocitopenia che insorgono dopo la chemioterapia o il trapianto autologo di midollo osseo.

Stimolazione aspecifica del sistema immunitario

Le risposte immunitarie antitumorali possono essere stimolate mediante la somministrazione topica di sostanze infiammatorie o la somministrazione sistemica di agenti che funzionano come attivatori policlonali dei linfociti. Per molti anni la stimolazione aspecifica del sistema immunitario nei pazienti tumorali è stata ottenuta mediante inoculo peritumorale di sostanze ad azione infiammatoria, come il bacillo inattivato di Calmette-Guérin (*Bacillus Calmette-Guérin*, BCG). Il micobatterio BCG attiva i macrofagi e quindi promuove l’uccisione delle cellule tumorali. Inoltre, i batteri funzionano come adiuvanti e possono stimolare risposte T. L’istillazione intravescicale del micobatterio BCG è attualmente utilizzata per trattare i tumori della vescica.

Le terapie con citochine, analizzate in precedenza, rappresentano un ulteriore modo per incrementare le risposte immunitarie in maniera aspecifica.

Immunoterapia passiva con linfociti T e anticorpi

L'immunoterapia passiva implica il trasferimento di cellule effettrici della risposta immunitaria, come linfociti T tumore-specifici e immunoglobuline. L'immunizzazione passiva contro i tumori è rapida ma non persiste a lungo. Alcuni anticorpi sono già stati autorizzati per il trattamento di specifiche neoplasie, mentre altri sono in corso di sperimentazione, con risultati ambigui.

Immunoterapia cellulare

L'immunoterapia cellulare consiste nel trasferimento di leucociti con attività antitumorale in un ricevente affetto da tumore. Le cellule immunitarie vengono ottenute da un campione di sangue o del tumore del paziente, trattate in vari modi per aumentarne il numero e l'attività antitumorale, e poi reinfuse nel paziente stesso (Fig. 18-6, *A*).

FIGURA 18-6 Immunoterapia cellulare adottiva. I linfociti isolati dal sangue o dall'infiltrato tumorale di un paziente possono essere espansi *in vitro* mediante coltura con IL-2 prima di essere re-inoculati nel paziente. (**A**). I linfociti possono essere transfettati con i geni CAR (**B**). Questo trattamento, che viene spesso associato a una terapia sistemica con IL-2, ha portato alla regressione dei tumori in alcuni pazienti. In alcuni casi, i linfociti T del paziente possono essere geneticamente trasdotti *ex vivo* per esprimere i recettori chimerici per l'antigene (CAR) prima di essere nuovamente trasferiti al paziente. I CAR (**B**) sono composti da domini recettoriali specifici per gli antigeni tumorali e da domini di trasduzione del segnale, quali i domini ITAM e le regioni citosoliche di CD28, che promuovono una forte attivazione dei linfociti T.

La terapia adottiva che utilizza linfociti T ingegnerizzati per esprimere recettori chimerici per l'antigene (*Chimeric Antigen Receptor*, CAR) si è dimostrata efficace contro alcune patologie ematologiche maligne, e lo stesso approccio è attualmente in fase di sperimentazione per altri tumori. I CAR sono recettori geneticamente ingegnerizzati, dotati di siti di legame antigene-specifici codificati da geni variabili di immunoglobuline e di code citoplasmatiche contenenti i domini responsabili della trasduzione del segnale, sia del recettore per l'antigene sia delle molecole costimolatorie (Fig. 18-6, *B*). I protocolli attuali prevedono l'isolamento dei linfociti T dal sangue periferico, la loro stimolazione con anticorpi anti-CD3 e/o anti CD-28 e la loro

trasduzione con vettori che codificano per CAR. I linfociti T esprimenti CAR sono poi espansi *in vitro* e iniettati nuovamente al paziente, dove vanno incontro a forte proliferazione in seguito al riconoscimento dell'antigene tumorale. L'eliminazione del tumore si realizza tramite meccanismi citotossici diretti e mediati da citochine. I pazienti con tumori maligni dei linfociti B, tra cui la leucemia linfocitica cronica e la leucemia linfoblastica acuta, sono stati trattati con successo con linfociti T in grado di esprimere CAR specifici per CD19, un marcatore di tutti i linfociti B espresso anche dalle cellule tumorali. Con questo approccio vengono eliminati anche i linfociti B normali, tuttavia i pazienti tollerarono questa terapia in quanto le cellule a lunga sopravvivenza che producono anticorpi non esprimono CD19 e non sono quindi danneggiate. Un ostacolo importante che limita l'uso della terapia antitumorale tramite linfociti T-CAR, per esempio nei carcinomi, è l'identificazione di antigeni bersaglio che siano relativamente specifici per il tumore.

Un protocollo alternativo, più datato, dell'immunoterapia cellulare adottiva consiste nel generare cellule LAK prelevando i leucociti circolanti dal paziente, coltivandoli in presenza di alte concentrazioni di IL-2 e reinfondendoli poi al paziente stesso. Come detto in precedenza, le cellule LAK derivano principalmente dalle cellule NK. La terapia adottiva con cellule LAK autologhe, in concomitanza con la somministrazione *in vivo* di IL-2 o di farmaci chemioterapici, ha prodotto risultati straordinari nel topo, portando alla regressione di tumori solidi. I test clinici sull'uomo si sono finora limitati a casi avanzati di tumori metastatici e l'efficacia di tale approccio sembra variare da paziente a paziente. Una variante di questo approccio consiste nell'isolare i TIL dall'infiltrato infiammatorio presente all'interno e nelle vicinanze dei tumori solidi. I TIL isolati vengono espansi mediante coltura *in vitro* in presenza di IL-2 prima di essere reinfusi nel paziente. Il razionale di questo approccio è che i TIL possono essere particolarmente ricchi di CTL specifici per il tumore e di cellule NK attivate. La terapia con i TIL per il melanoma metastatico è utilizzata in molti centri clinici.

Effetto reazione del trapianto verso leucemia

Nei pazienti affetti da leucemia, la somministrazione di linfociti T e cellule NK insieme a cellule staminali ematopoietiche da donatore allogenico può contribuire all'eradicazione del tumore. L'effetto antileucemico è dovuto al riconoscimento da parte dei linfociti T del donatore delle molecole MHC

allogeniche presenti sulle cellule ematopoietiche, comprese le cellule leucemiche, del ricevente. Le cellule NK del donatore rispondono alle cellule tumorali in quanto i tumori esprimono bassi livelli di MHC di classe I, molecole che inibiscono l'attivazione delle cellule NK (vedi Cap. 4). Per sfruttare al meglio questa reazione e migliorare l'efficacia clinica del trattamento è necessario però prevenire l'insorgenza della reazione del trapianto contro l'ospite (*Graft Versus Host Disease*, GVHD) che può essere scatenata dagli stessi linfociti T del donatore (vedi Cap. 17).

Terapia con anticorpi tumore-specifici

Gli anticorpi monoclonali tumore-specifici possono essere utili per l'immunoterapia dei tumori. La possibilità di utilizzare gli anticorpi come "proiettili magici" è stata per molti anni particolarmente affascinante e ancora oggi la sperimentazione è attiva in questo campo. Attualmente, esistono più di 100 diversi anticorpi monoclonali in fase di sperimentazione in modelli animali e nell'uomo; alcuni di questi sono già stati approvati per l'utilizzo clinico (Tab. 18-3). Gli anticorpi specifici per il tumore possono eliminare le cellule tumorali con gli stessi meccanismi effettori normalmente usati per eliminare i microrganismi, come l'opsonizzazione, la fagocitosi e l'attivazione del sistema del complemento (vedi Cap. 13). Questi meccanismi sono verosimilmente coinvolti negli effetti osservati nei pazienti con linfoma a cellule B curati con anti-CD20, uno dei trattamenti di maggior successo. Inoltre, alcuni anticorpi possono direttamente attivare l'apoptosi delle cellule tumorali, come si pensa che avvenga per l'anticorpo anti-CD30 utilizzato nella terapia dei linfomi. Un anticorpo monoclonale specifico per il prodotto dell'oncogene HER2/Neu è approvato per il trattamento di pazienti con tumore alla mammella, quando il tumore esprime alti livelli di questa proteina. Oltre a stimolare le funzioni effettrici delle risposte immunitarie, l'anticorpo anti-HER-2/Neu interferisce con i segnali di crescita indotti dalla molecola HER-2/Neu.

TABELLA 18-3 Anticorpi monoclonali in sperimentazione clinica o approvati per terapie antitumorali

Specificità dell'anticorpo	Forma dell'anticorpo usato	Uso clinico
HER2/Neu (recettore EGF, oncogene)	Anticorpo monoclonale murino umanizzato	Carcinoma della mammella (approvato)
CD20 (marker dei linfociti B)	Anticorpo monoclonale	Linfoma a cellule B (approvato)

	murino umanizzato	
CD52 (marcatore linfocitico)	Anticorpo monoclonale murino umanizzato	Linfoma a cellule B (approvato)
Antigene carcinoembrionale	Anticorpo monoclonale murino umanizzato	Tumori del tratto gastrointestinale (diagnostica per immagini)
CA-125 (marcatore tumorale)	Anticorpo monoclonale murino	Diagnostica del carcinoma ovarico
Ganglioside GD_3 (antigene tumorale)	Anticorpo monoclonale murino umanizzato	Melanoma, neuroblastoma (in corso di sperimentazione)

Gli anticorpi utilizzati nei primi studi clinici erano anticorpi monoclonali murini e per questo motivo spesso nel paziente insorgeva una risposta immunitaria contro le immunoglobuline di topo, con formazione di anticorpi antitopo responsabili dell'eliminazione degli anticorpi terapeutici o del blocco del loro legame al bersaglio. Il problema è stato ridotto con l'uso di anticorpi umanizzati, che utilizzano le regioni variabili di un anticorpo monoclonale murino specifico per l'antigene tumorale coniugate con la porzione Fc di una Ig umana. Una delle maggiori difficoltà che si incontrano nella terapia antitumorale con anticorpi è la crescita di cloni di cellule tumorali che non esprimono più gli antigeni riconosciuti dagli anticorpi. Un modo per evitare questo problema può essere l'uso di cocktail di anticorpi specifici per diversi antigeni espressi dallo stesso tumore.

Molteplici strategie sono state usate per cercare di migliorare l'efficacia delle terapie antitumorali basate sull'impiego di anticorpi. Gli anticorpi possono essere accoppiati a molecole tossiche, radioisotopi o farmaci antitumorali per promuovere il rilascio specifico di questi agenti in corrispondenza delle cellule tumorali. Tossine come la ricina e la tossina difterica sono potenti inibitori della sintesi proteica e possono essere efficaci in dosi estremamente basse, se sono veicolate ai tumori legate ad anticorpi; tali coniugati sono chiamati *immunotossine*. Questo approccio terapeutico richiede il legame covalente della tossina (priva della porzione in grado di legare la cellula) a un anticorpo specifico per il tumore, senza che vengano perse né la tossicità né la specificità anticorpale. L'immunotossina iniettata per via sistemica viene endocitata dalle cellule tumorali e la tossina viene rilasciata al suo sito di azione intracellulare. Molte difficoltà pratiche devono ancora essere superate per rendere veramente efficace questa tecnica. La specificità dell'anticorpo deve essere tale da evitare il suo legame a cellule non tumorali. Una sufficiente quantità di anticorpo deve raggiungere l'appropriato bersaglio

tumorale prima di essere eliminata dai fagociti circolanti che esprimono il recettore per l'Fc. Le tossine, i farmaci o i radioisotopi coniugati agli anticorpi possono inoltre avere effetti sistemici causati dalla distribuzione nei tessuti normali. Per esempio, l'epatotossicità e l'aumento della permeabilità vascolare sono problemi frequenti nella terapia con le immunotossine. La somministrazione di immunotossine può causare risposte anticorpali contro le tossine stesse o contro gli anticorpi somministrati. A causa di queste difficoltà pratiche, i test clinici con le immunotossine hanno prodotto risultati variabili e in genere modesti.

La crescita tumorale si basa sulla disponibilità dei fattori di crescita che possono costituire il bersaglio di terapie antitumorali. Gli anticorpi diretti verso il recettore del fattore di crescita epidermico (*Epidermic Growth Factor*, EGF), sono stati approvati per il trattamento dei tumori del colon e del retto. I tumori necessitano della formazione di nuovi vasi che li alimentino con ossigeno e nutrimento. Questo processo, chiamato *angiogenesi tumorale*, dipende dalla produzione di fattori di crescita specializzati, come il VEGF, e vari inibitori diretti contro i fattori angiogenetici sono in grado di bloccare sperimentalmente la crescita tumorale. Gli anticorpi diretti contro il VEGF sono stati recentemente approvati per l'impiego clinico nel trattamento dei tumori metastatici, in combinazione con agenti chemioterapici, anche se va detto che la loro efficacia è modesta.

RUOLO DELL'IMMUNITÀ INNATA E ADATTIVA NELLA PROGRESSIONE TUMORALE

Pur riconoscendo che il sistema immunitario ha la capacità di eradicare i tumori, è altresì chiaro che la risposta immunitaria può contribuire allo sviluppo di alcuni tumori solidi. Di fatto, l'infiammazione cronica è da tempo ritenuta un fattore di rischio per lo sviluppo tumorale, specialmente per i pazienti affetti da patologie infiammatorie croniche come l'esofago di Barrett, il morbo di Crohn e la colite ulcerosa. Alcuni tumori normalmente associati a processi infettivi sono, inoltre, considerati una conseguenza indiretta degli effetti carcinogeni del processo di infiammazione cronica indotto dall'agente infettivo: tra questi vi sono i carcinomi e i linfomi dello stomaco associati

all’infezione cronica da *Helicobacter pylori* e i carcinomi epatici, associati ai virus dell’epatite B e C. Nonostante gli esperimenti condotti su modelli animali supportino il ruolo dell’infiammazione cronica nello sviluppo tumorale, il meccanismo di questa azione non è noto. Le cellule dell’immunità naturale sembrano essere quelle maggiormente coinvolte. I macrofagi M2 (alternativamente attivati) associati al tumore, così come altri tipi di cellule, sono fonti di VEGF, che promuove l’angiogenesi, e di metalloproteasi, che modificano il tessuto extracellulare. Quindi, l’attivazione cronica soprattutto dei macrofagi è associata al processo di angiogenesi e di rimodellamento tissutale, eventi che favoriscono la crescita tumorale e l’invasività locale. Le cellule dell’immunità naturale possono anche promuovere la trasformazione neoplastica attraverso la produzione di radicali liberi che causano danni al DNA e portano a mutazioni nei geni oncosoppressori e negli oncogeni. Alcuni dati suggeriscono che i mastociti, i neutrofili e i macrofagi producono fattori solubili che promuovono la replicazione e la sopravvivenza delle cellule tumorali. Il fattore trascrizionale NF-κB, un mediatore fondamentale delle risposte immunitarie innate, sembra svolgere un ruolo importante nella progressione tumorale associata all’infiammazione.

L’immunità specifica può, a sua volta, promuovere in modo diretto l’attivazione dell’immunità innata attraverso molteplici meccanismi, come l’attivazione dei macrofagi da parte dei linfociti T, a loro volta attivati da infezioni persistenti da parte di microrganismi intracellulari ma anche in assenza di agenti infettivi. Ci sono anche evidenze del fatto che i linfociti B contribuiscono alla progressione tumorale sia mediante il rilascio di fattori che regolano direttamente la capacità proliferativa delle cellule trasformate sia attraverso la loro capacità di attivare cronicamente le cellule dell’immunità innata presenti nelle lesioni neoplastiche precoci. Il ruolo della risposta immunitaria nella progressione neoplastica è paradossale e costituisce un’area di attiva ricerca. Potenzialmente, molteplici effetti dell’infiammazione cronica potrebbero essere controllati da parte di uno dei tanti farmaci antinfiammatori oggi disponibili. L’attuale sfida in oncologia è rappresentata dalla possibilità di raggiungere un equilibrio vantaggioso tra gli effetti protettivi dell’immunità specifica e quelli potenzialmente dannosi dovuti a una risposta infiammatoria che promuove la crescita tumorale.

RIEPILOGO

* I tumori esprimono antigeni riconosciuti dal sistema immunitario, tuttavia la maggior parte dei tumori sopprime le risposte immunitarie, è debolmente immunogenica e le risposte immunitarie spesso non riescono a prevenirne lo sviluppo. Il sistema immunitario può però essere stimolato a eliminare efficacemente i tumori.
* Gli antigeni tumorali identificati dai CTL sono i principali induttori, nonché i bersagli, dell'immunità antitumorale. Questi antigeni comprendono le forme mutate degli oncogeni e di altre proteine, proteine normali la cui espressione è sregolata o incrementata nei tumori e nei prodotti dei virus oncogeni.
* Gli anticorpi specifici per le cellule tumorali riconoscono gli antigeni che sono potenziali bersagli per la terapia anticorpale e sono spesso utilizzati per la diagnosi. Questi antigeni comprendono gli antigeni oncofetali, espressi normalmente durante la vita fetale e la cui espressione è sregolata in alcuni tumori, le glicoproteine e glicolipidi alterati di superficie e le molecole che sono normalmente espresse dalle cellule da cui originano i tumori e sono quindi antigeni di differenziazione di particolari tipi cellulari.
* Le risposte immunitarie che possono uccidere le cellule tumorali sono mediate da CTL, le cellule NK e macrofagi attivati. Tra questi diversi meccanismi, il ruolo dei CTL è quello meglio definito.
* I tumori eludono la risposta immunitaria attraverso numerosi meccanismi, tra cui la modulazione negativa dell'espressione delle molecole MHC, la selezione di cellule che non esprimono antigeni tumorali, la produzione di sostanze immunosoppressive solubili, l'ingaggio dei recettori inibitori sui linfociti da parte dei loro ligandi espressi dalle cellule tumorali, nonché l'induzione di linfociti T regolatori. I macrofagi e le cellule MDSC presenti in diversi tumori solidi sono in grado di sopprimere la risposta immunitaria antitumorale.
* L'immunoterapia mira ad aumentare le risposte immunitarie contro i tumori o a somministrare ai pazienti meccanismi effettori tumore-specifici. L'immunità antitumorale può essere potenziata bloccando i meccanismi che inibiscono la risposta immunitaria. Le risposte immunitarie possono inoltre essere attivamente stimolate dalla vaccinazione con cellule o antigeni tumorali e dalla somministrazione sistemica di citochine che attivano le risposte immunitarie. La strategia efficace più recente è il cosiddetto blocco del checkpoint, dove la somministrazione di anticorpi che agiscono contro i recettori inibitori dei linfociti T o dei loro ligandi mira a rimuovere i blocchi all'attivazione dei linfociti e quindi promuovere l'immunità antitumorale.
* L'immunoterapia passiva comprende la somministrazione di anticorpi specifici coniugati o meno con composti tossici (immunotossine) e l'infusione di linfociti T e cellule NK reattive verso il tumore, precedentemente isolate dai pazienti tumorali e fatte proliferare *in vitro* in presenza di fattori di crescita. Un nuovo approccio che si annuncia promettente è il trasferimento adottivo dei linfociti T transfettati per esprimere recettori chimerici verso gli antigeni tumorali.

LETTURE CONSIGLIATE

Risposta immunitaria verso i tumori

Boon T.; Coulie P.G.; Van den Eynde B.J.; van der Bruggen P: Human T cell responses against melanoma. *Annual Review of Immunology* 24:175–208 (2006).

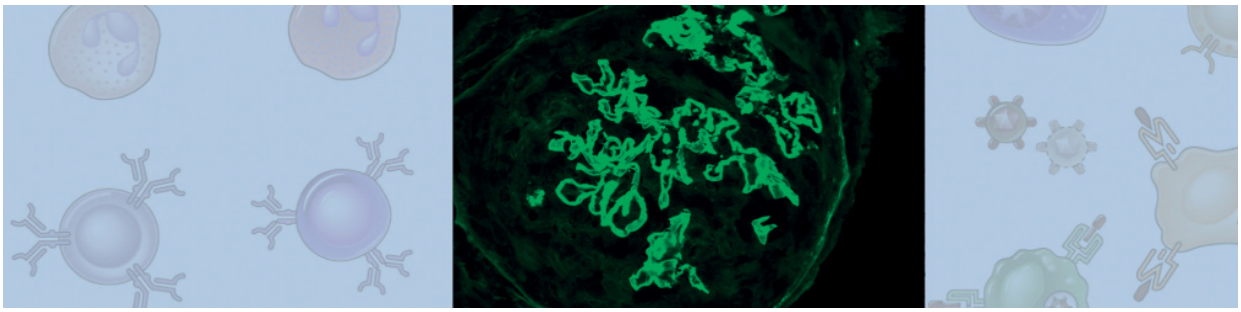
Burnet F.M.. The concept of immunological surveillance. *Progress in Experimental Tumor Research* 13 1–27 (1970).
Coussens L.M.; Zitvogel L.; Palucka A.K: Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science* 339:286–291 (2013).
Fridman W.H.; Pages F.; Sautes-Fridman C.; Galon J: The immune contexture in human tumors: impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer* 12:298–306 (2012).
Gajewski T.F.; Schreiber H.; Fu Y.X: Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology* 14:1014–1022 (2013).
Grivennikov S.I.; Greten F.R.; Karin M: Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140:883–899 (2010).
Mantovani A.; Allavena P.; Sica A.; Balkwill F: Cancer-related inflammation. *Nature* 454:436–444 (2008).
Schreiber R.D.; Old L.J.; Smyth M.J: Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331:1565–1570 (2011).

Immunoterapia dei tumori

Curiel T.J: Regulatory T cells and treatment of cancer. *Current Opinions in Immunology* 20:241–246 (2008).
Dranoff G: Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 4:11–22 (2004).
Farkas A.M.; Finn O.J: Vaccines based on abnormal self-antigens as tumor-associated antigens: immune regulation. *Seminars in Immunology* 22:125–131 (2010).
Gilboa E: DC-based cancer vaccines. *Journal of Clinical Investigation* 117:1195–1203 (2007).
Kalos M.; June C.H: Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology. *Immunity* 39:49–60 (2013).
Maus M.V.; Fraietta J.A.; Levine B.L.; Kalos m.; Zhao Y.; June C.H: Adoptive immunotherapy for cancer and viruses. *Annual Review of Immunology* 32:189–225 (2014).
Mellman I.; Coukos G.; Dranoff G: Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480:480–489 (2012).
Mougiakakos D.; Choudhury A.; Lladser A.; Kiessling R.; Johansson C.C: Regulatory T cells in cancer. *Advances in Cancer Research* 107:57–117 (2010).
Page D.B.; Postow M.A.; Callahan M.K.; Allison J.P.; Wolchok J.D: Immune modulation in cancer with antibodies. *Annual Review of Medicine* 65:185–202 (2014).
Palucka K.; Banchereau J: Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity* 39:38–48 (2013).
Pardoll D.M: The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reivews Cancer* 12:252–264 (2012).
Topalian S.L.; Weiner G.J.; Pardoll D.M: Cancer immunotherapy comes of age. *Journal of Clinical Oncology* 29:4828–4836 (2011).
Vanneman M.; Dranoff G.M: Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nature Reviews Cancer* 12:237–251 (2012).
Weiner L.M.; Surana R.; Wang S: Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 10:317–327 (2010).

CAPITOLO

19



Malattie da ipersensibilità

CAUSE DELLE MALATTIE DA IPERSENSIBILITÀ

MECCANISMI MOLECOLARI E CLASSIFICAZIONE DELLE REAZIONI DI IPERSENSIBILITÀ

MALATTIE CAUSATE DA ANTICORPI

- Malattie causate da anticorpi contro antigeni espressi da cellule e tessuti
- Malattie da immunocomplessi

MALATTIE CAUSATE DAI LINFOCITI T

- Malattie causate da citochine proinfiammatorie
- Malattie causate da linfociti T citotossici

APPROCCI TERAPEUTICI ALLE MALATTIE SU BASE IMMUNITARIA

PATOGENESI E STRATEGIE TERAPEUTICHE PER ALCUNE MALATTIE SU BASE IMMUNITARIA

- Lupus eritematoso sistemico (LES) come prototipo di malattia da immunocomplessi
- Artrite reumatoide
- Sclerosi multipla
- Diabete mellito di tipo
- Malattie infiammatorie intestinali

RIEPILOGO

L’immunità specifica esercita l’importante funzione di difesa dell’ospite contro le infezioni microbiche; tuttavia non è infrequente che le risposte immunitarie provochino, esse stesse, danno tissutale e malattia. Le malattie con patogenesi immunitaria sono definite **malattie da ipersensibilità**. Questo termine deriva dall’accezione clinica di immunità come “sensibilità” e si basa sull’osservazione che un individuo esposto precedentemente a un antigene mostri una reazione qualitativamente diversa (si dimostri, cioè, già “sensibile” o reattivo) a un successivo incontro con lo stesso antigene. Normalmente, le risposte immunitarie eliminano i microrganismi senza causare gravi lesioni ai tessuti dell’ospite. Talvolta però queste risposte non vengono controllate adeguatamente oppure si rivolgono in modo inappropriato contro i tessuti dell’ospite, o sono scatenate da microrganismi commensali o da antigeni ambientali normalmente innocui. In queste situazioni, la risposta, che normalmente svolge un ruolo protettivo, diventa essa stessa causa di malattia.

In questo capitolo descriveremo la patogenesi dei diversi tipi di reazioni di ipersensibilità, con particolare enfasi sui meccanismi effettori che causano danno tissutale e autoimmunità. A questo scopo, faremo spesso riferimento a situazioni cliniche e sperimentali. Il capitolo si concluderà con esempi di malattie utili a chiarire alcuni importanti principi biologici, con un breve accenno alla terapia di malattie con patogenesi immunitaria.

CAUSE DELLE MALATTIE DA IPERSENSIBILITÀ

Le risposte immunitarie nei confronti di diverse tipologie di antigeni possono causare malattie da ipersensibilità.

- ***Autoimmunità: reazioni contro antigeni self***. Il mancato funzionamento dei normali meccanismi di tolleranza al "self" provoca una reazione contro le proprie cellule e/o tessuti nota come **autoimmunità** (vedi Cap. 15). Le malattie causate da una risposta autoimmune sono dette **malattie autoimmuni**. Si stima che almeno il 2-5% della popolazione dei Paesi sviluppati ne sia afflitta e che l'incidenza di tali malattie stia aumentando. Molte di queste si manifestano in individui di età compresa tra i 20 e i 40 anni. Per ragioni ancora sconosciute, esse sono più frequenti nelle donne che negli uomini. Le malattie autoimmuni sono croniche e debilitanti e hanno un elevato impatto sanitario ed economico. Sebbene in passato non si conoscessero trattamenti adeguati per queste patologie, l'inizio del XXI secolo ha assistito allo sviluppo di diversi approcci che si sono dimostrati scientificamente efficaci. I meccanismi dell'autoimmunità sono stati descritti nel Capitolo 15; in questo capitolo, invece, faremo riferimento ad alcune malattie autoimmuni per spiegare come l'autoimmunità possa essere causa di malattia.
- ***Risposte contro i microrganismi***. Le risposte contro gli antigeni microbici possono causare malattia nel momento in cui diventano abnormi oppure nel caso in cui i microbi persistano nell'organismo per tempi prolungati. Le risposte dei linfociti T nei confronti di

microrganismi persistenti possono provocare infiammazione grave, talora con formazione di un granuloma, che è la principale causa di danno tissutale nella tubercolosi e in altre infezioni croniche. Nel caso in cui siano stati prodotti anticorpi contro antigeni microbici, questi si possono legare ai microrganismi formando immunocomplessi che, depositandosi nei tessuti, innescano una risposta infiammatoria. Meno comune è il caso in cui anticorpi o linfociti T specifici per un antigene microbico cross-reagiscano con i tessuti dell'ospite. In alcune malattie dell'intestino, definite malattie infiammatorie intestinali, la risposta immunitaria è diretta contro batteri commensali che risiedono normalmente nell'intestino senza che questi siano causa di alcun danno. Talvolta i meccanismi che una risposta immunitaria utilizza per eradicare un patogeno richiedono l'eliminazione di cellule dell'ospite che albergano il patogeno, con inevitabile danno tissutale. Per esempio, in corso di epatite virale, il virus dell'epatite non è citopatico, ma viene riconosciuto come estraneo dal sistema immunitario. I linfociti T citotossici (*Cytotoxic T Lymphocytes*, CTL) tentano quindi di eliminare le cellule infettate, ma questa fisiologica reazione immunitaria finisce con il danneggiare il tessuto epatico. In questo caso non si può quindi parlare propriamente di ipersensibilità.

- ***Risposte immunitarie verso antigeni ambientali***. Nonostante la maggior parte degli individui sani non reagisca nei confronti delle comuni sostanze ambientali (generalmente non dannose), quasi il 20% della popolazione reagisce in maniera abnorme a uno o più di tali antigeni. In particolare, questi individui producono immunoglobuline E (IgE) che sono causa di allergie (vedi Cap. 20). Alcuni individui si sensibilizzano agli antigeni ambientali o chimici per contatto, attraverso la cute, innescando risposte immunitarie mediate da linfociti T che liberano citochine e provocano una risposta infiammatoria definita ipersensibilità da contatto.

Indipendentemente dalle cause, i meccanismi patogenetici del danno tissutale sono gli stessi normalmente utilizzati per eradicare i patogeni, tra cui risposte immunitarie innate e adattive che implicano l'azione di fagociti, anticorpi, linfociti T, mastociti, altre cellule effettrici e mediatori dell'infiammazione. Il problema nelle risposte da ipersensibilità, allorché

diventano dannose, è la mancanza di un controllo adeguato della risposta immunitaria stessa, una volta iniziata. Ciò può avvenire essenzialmente per due motivi: perché risulta difficile o impossibile eliminare gli stimoli che scatenano questo tipo di risposte (per esempio autoantigeni, microrganismi commensali, antigeni ambientali), oppure per la presenza di molteplici meccanismi di amplificazione, tipici del funzionamento del sistema immunitario (feedback positivi). Le patologie da ipersensibilità tendono, pertanto, a cronicizzarsi, sono generalmente progressive e rappresentano una delle sfide terapeutiche più importanti in ambito clinico.

MECCANISMI MOLECOLARI E CLASSIFICAZIONE DELLE REAZIONI DI IPERSENSIBILITÀ

Le malattie da ipersensibilità vengono comunemente classificate in base al tipo di risposta e al tipo di meccanismo effettore responsabile del danno cellulare e tissutale (Tab. 19-1).

TABELLA 19-1 Classificazione delle malattie da ipersensibilità

Tipo di ipersensibilità	Meccanismi patologici	Meccanismi di danno tissutale e malattia
Tipo I: immediata	Anticorpi IgE, linfociti T_H2	Mastociti, eosinofili e i loro mediatori (amine vasoattive, mediatori lipidici, citochine)
Tipo II: mediata da anticorpi	Anticorpi IgM e IgG rivolti contro antigeni di superficie o della matrice extracellulare	Opsonizzazione e fagocitosi delle cellule Reclutamento e attivazione dei leucociti a opera del complemento e del recettore per Fc (neutrofili, macrofagi) Anomalie funzionali, per es. trasmissione del segnale dei recettori ormonali, blocco dei

		recettori dei neurotrasmettitori
Tipo III: mediata da immunocomplessi	Immunocomplessi formati da antigeni circolanti e da anticorpi IgM o IgG	Reclutamento e attivazione dei leucociti a opera del complemento e del recettore per Fc
Tipo IV: mediata dai linfociti T	1. Linfociti T $CD4^+$ + (T_H1 e T_H17) 2. CTL $CD8^+$	1. Infiammazione mediate dalle citochine 2. Uccisione diretta delle cellule bersaglio, infiammazione mediata dalle citochine

- L'ipersensibilità immediata (ipersensibilità di tipo I) è causata da IgE specifiche per antigeni ambientali. Essa rappresenta il tipo principale di malattia da ipersensibilità e verrà descritta nel Capitolo 20. L'ipersensibilità di tipo I viene comunemente definita allergia o atopia ed è il prototipo delle malattie causate dall'attivazione dei linfociti T helper, di norma i linfociti T_H2, che producono IL-4, IL-5 e IL-13; nel corso di queste risposte, i linfociti T inducono la produzione di IgE e sostengono lo stato infiammatorio.
- Le IgG e le IgM possono causare danno tissutale attivando la cascata del complemento, reclutando cellule dell'infiammazione e interferendo con le normali funzioni cellulari. Alcuni di questi anticorpi riconoscono in modo specifico gli antigeni espressi da un particolare tipo cellulare o presenti nella matrice extracellulare e si ritrovano complessati a cellule o tessuti oppure in forma libera in circolo; le malattie provocate da tali anticorpi sono chiamate reazioni di ipersensibilità di tipo II. Altri anticorpi possono formare immunocomplessi circolanti, che successivamente si depositano nei tessuti (soprattutto sulla parete vascolare), danneggiandoli. Le malattie da immunocomplessi sono anche definite reazioni di ipersensibilità di tipo III.
- Il danno tissutale può essere dovuto a linfociti T che promuovono l'infiammazione o che eliminano direttamente le cellule bersaglio; tali condizioni sono note come reazioni di ipersensibilità di tipo IV. Queste reazioni sono mediate dall'attivazione dei linfociti helper $CD4^+$ che, producendo citochine proinfiammatorie, causano l'attivazione dei

leucociti reclutati (soprattutto neutrofili e macrofagi). I linfociti T helper stimolano inoltre la produzione di anticorpi responsabili del danno tissutale e dell'infiammazione stessa. Infine, in alcune patologie, CTL possono contribuire al danno tissutale.

Questa classificazione è utile e opportuna poiché le risposte patologiche del sistema immunitario causano diversi tipi di danno tissutale e possono assumere specificità di tessuto. In altre parole, i diversi meccanismi immunitari alla base di queste risposte causano reazioni locali con caratteristiche clinicopatologiche diverse. Nell'uomo, tuttavia, le malattie su base immunitaria si manifestano spesso in modo complesso, come risultato di molteplici meccanismi effettori che agiscono in modo sinergico nell'ambito delle risposte umorali e cellulari. Questa complessità non è sorprendente se si considera che un unico antigene può stimolare risposte sia umorali sia cellulari, attraverso le quali sono prodotti diversi tipi di anticorpi e di linfociti T effettori. Alla luce dei molteplici meccanismi d'azione coinvolti e del loro reiterarsi stereotipato, che rappresenta la componente principale della patologia nonché la manifestazione clinica del disturbo, le malattie da ipersensibilità vengono spesso indicate come **malattie infiammatorie immunomediate**. Questa definizione ha anche una valenza clinica poiché, come si vedrà più avanti in questo capitolo, molte di queste malattie vengono indistintamente trattate mediante l'utilizzo di simili (se non identici) agenti terapeutici, noti come farmaci biologici. Nella discussione che segue, useremo una terminologia che identifica il meccanismo patogenetico piuttosto che la meno informativa designazione numerica per i diversi tipi di ipersensibilità. Con queste conoscenze preliminari, procediamo pertanto alla descrizione delle malattie mediate da anticorpi e linfociti T.

MALATTIE CAUSATE DA ANTICORPI

Queste malattie sono provocate da anticorpi che legano antigeni espressi da particolari cellule o presenti nella matrice extracellulare o da complessi antigene-anticorpo che si sono formati in circolo per poi depositarsi a livello delle parete vascolare (Fig. 19-1). Per dimostrare che una particolare

malattia è causata da anticorpi, è necessario provare che le lesioni sono riproducibili nell'animale sano mediante il trasferimento di Ig purificate dal sangue, o dai tessuti, di soggetti malati. Una situazione di questo tipo si osserva occasionalmente nei bambini nati da madri affette da malattie da anticorpi circolanti. Questi neonati possono nascere con manifestazioni transitorie della stessa malattia dovute al passaggio transplacentare degli anticorpi materni. Nella pratica clinica, tuttavia, la diagnosi delle malattie causate da anticorpi o da immunocomplessi si basa solitamente sull'identificazione degli anticorpi o degli immunocomplessi in circolo o depositati nei tessuti, nonché sulle analogie clinicopatologiche con condizioni sperimentali in cui il ruolo degli anticorpi nell'eziologia della malattia sia stato dimostrato mediante trasferimento adottivo con siero.

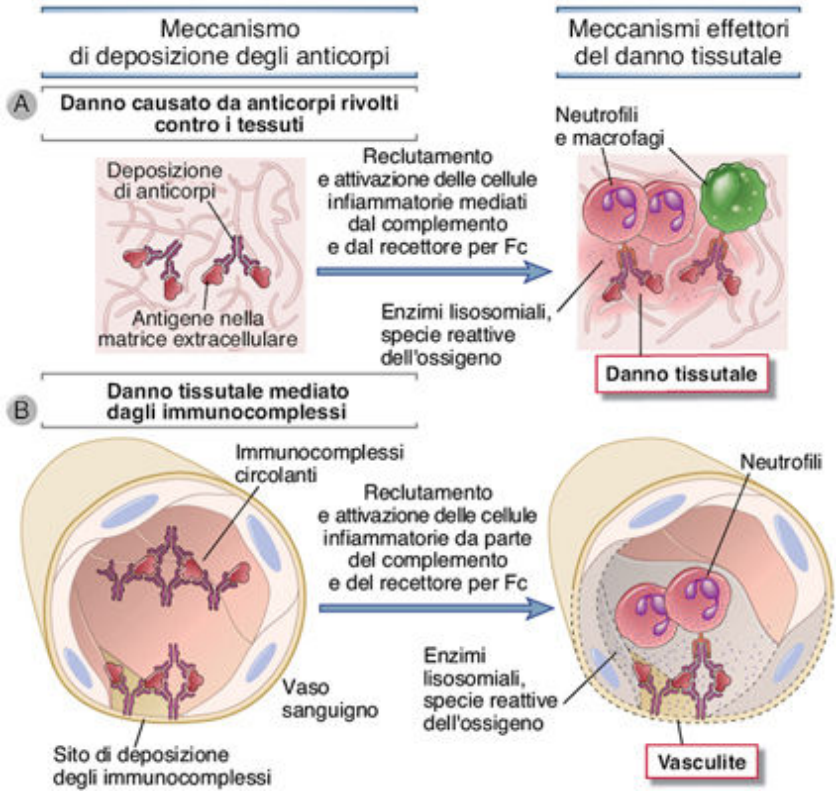


FIGURA 19-1 Malattie mediate da anticorpi. A. Gli anticorpi possono legarsi in maniera specifica agli antigeni tissutali e i leucociti reclutati possono essere causa di danno tissutale. **B.** I complessi anticorpo-antigene che si formano in circolo si depositano nei vasi e in altri siti. Tali immunocomplessi inducono infiammazione vascolare e conseguente danno ischemico. Anche gli anticorpi diretti contro proteine cellulari possono causare danno tissutale e anomalie funzionali (non mostrato in figura).

Malattie causate da anticorpi contro antigeni espressi da cellule e tessuti

Gli anticorpi diretti contro gli antigeni cellulari o della matrice extracellulare provocano malattie che colpiscono in modo specifico le cellule e i tessuti nei quali tali antigeni sono presenti; generalmente, queste malattie non hanno manifestazioni sistemiche. Gli anticorpi rivolti contro antigeni tissutali assumono rilevanza patogenetica attraverso tre meccanismi principali (Fig. 19-2).

- ***Opsonizzazione e fagocitosi.*** Gli anticorpi che legano gli antigeni espressi sulla membrana di una cellula possono opsonizzarla direttamente o tramite l'attivazione della cascata del complemento (che andrà a opsonizzare la cellula). Le cellule opsonizzate saranno successivamente fagocitate ed eliminate dai fagociti che esprimono recettori per la porzione Fc delle Ig o per le proteine del complemento. Questo è il principale meccanismo citotossico che caratterizza l'anemia emolitica autoimmune e la porpora trombocitopenica autoimmune, condizioni in cui gli anticorpi specifici, rispettivamente per i globuli rossi e le piastrine, determinano l'opsonizzazione e la rimozione di tali cellule dal sangue, ma anche emolisi nelle reazioni trasfusionali (vedi Cap. 17).
- ***Infiammazione.*** Gli anticorpi depositati a livello dei tessuti reclutano neutrofili e macrofagi che, legando gli anticorpi stessi o le proteine del complemento, ne risultano attivati, liberando così fattori citotossici (come enzimi lisosomali e specie reattive dell'ossigeno). Per esempio, il danno tissutale che si riscontra nella glomerulonefrite e in molte altre malattie è causato dall'infiammazione e dalla conseguente attivazione leucocitaria.
- ***Funzioni cellulari anomale.*** Gli anticorpi si possono anche legare a recettori (per specifici ligandi endogeni, quali ormoni o neurotrasmettitori; *N.d.T.*) o a proteine della cellula e interferire con le loro funzioni. Gli anticorpi specifici per i recettori dell'ormone che stimola la tiroide o il recettore nicotinico dell'acetilcolina causano alterazioni funzionali che portano, rispettivamente, alla malattia di Graves e alla *miastenia gravis* (Fig. 19-2, *C*). Anticorpi specifici per il

fattore intrinseco, necessario per l'assorbimento della vitamina B_{12}, causano l'anemia perniciosa.

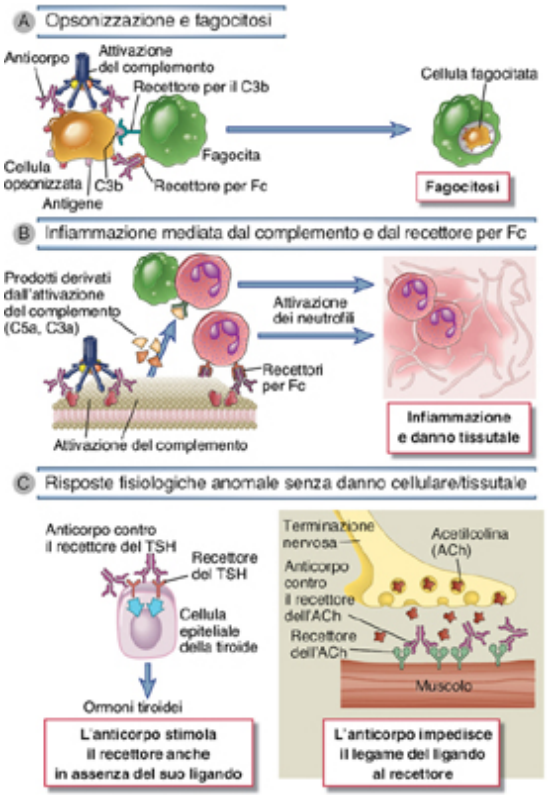


FIGURA 19-2 Meccanismi effettori delle malattie mediate da anticorpi. A. Gli anticorpi opsonizzano le cellule direttamente o a seguito dell'attivazione del complemento. Le cellule opsonizzate possono quindi essere fagocitate dai leucociti dotati di recettori per Fc o per il C3b. **B.** Gli anticorpi reclutano leucociti mediante il legame ai recettori per Fc o in seguito all'attivazione del complemento e il conseguente rilascio di sostanze chemotattiche. **C.** Gli anticorpi che legano i recettori per gli ormoni o per i neurotrasmettitori possono stimolare la trasduzione del segnale anche in assenza dell'ormone, come nel morbo di Graves (ipertiroidismo) (*riquadro a sinistra*) o inibire il legame del recettore al suo neurotrasmettitore fisiologico, come nella *miastenia gravis* (*riquadro a destra*). TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*), ormone stimolante la tiroide.

Gli anticorpi che causano specifico danno cellulare o tissutale sono, in genere, prodotti nel contesto di una condizione autoimmune, ma talvolta gli anticorpi sono diretti verso componenti microbiche. Alcuni esempi di autoanticorpi diretti contro antigeni tissutali sono elencati nella Tabella 19-2. Più raramente, gli anticorpi possono essere prodotti contro un antigene esogeno (per esempio microbico) che è immunologicamente cross-reattivo con un componente self. Nel caso di infezioni ripetute da streptococchi che si rendono responsabili della febbre reumatica, gli anticorpi prodotti contro i

batteri cross-reagiscono con antigeni cardiaci, depositandosi a livello del cuore e causando infiammazione e danno locale. In alcune di queste malattie, la deposizione di anticorpi a livello tissutale può essere messa in evidenza mediante esami morfologici che rilevino l'attivazione locale del complemento, l'infiammazione e il danno tissutale (Fig. 19-3, *A*).

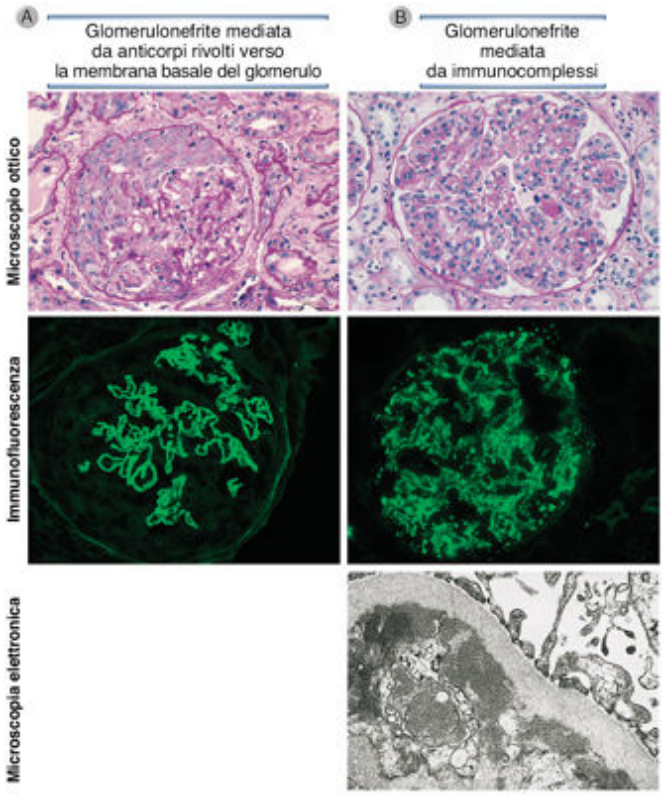


FIGURA 19-3 Caratteristiche immunopatologiche delle glomerulonefriti mediate da anticorpi. **A.** Glomerulonefrite indotta da anticorpi diretti contro la membrana basale del glomerulo (sindrome di Goodpasture): la fotografia ottenuta tramite microscopia ottica evidenzia l'infiammazione e il grave danno glomerulare, mentre la fotografia ottenuta tramite immunofluorescenza permette di evidenziare i depositi lineari di anticorpi lungo la membrana basale del glomerulo. **B.** Glomerulonefrite causata da deposizione di immunocomplessi (lupus eritematoso sistemico): la fotografia ottenuta tramite microscopia ottica evidenzia un quadro infiammatorio caratterizzato da infiltrazione di neutrofili, mentre le fotografie ottenute tramite immunofluorescenza e microscopia elettronica mostrano grossolani depositi di complessi antigene-anticorpo lungo la membrana basale dei glomeruli. (*Immagini ottenute tramite immunofluorescenza, per gentile concessione del Dr. Jean Olson, Department of Pathology, University of California San Francisco; fotografia ottenuta tramite microscopia elettronica, per gentile concessione del Dr. Helmut Rennke, Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts.*)

TABELLA 19-2 Esempi di malattie provocate da anticorpi specifici per cellule o tessuti

Malattia	Antigene bersaglio	Meccanismo	Manifestazioni

			clinicopatologiche
Anemia emolitica autoimmune	Proteine della membrana degli eritrociti	Opsonizzazione e fagocitosi degli eritrociti, lisi mediata dal complemento	Emolisi, anemia
Porpora trombocitopenica autoimmune	Proteine di membrana delle piastrine (integrina gpllb-llla)	Opsonizzazione e fagocitosi delle piastrine	Emorragie
Pemfigo volgare	Proteine della giunzione intercellulare delle cellule epidermiche (desmogleina)	Attivazione delle proteasi mediata da anticorpi, distruzione delle adesioni intercellulari	Vescicole cutanee (bolle)
Vasculite causata dagli ANCA	Proteine dei granuli dei neutrofili, presumibilmente rilasciate dai neutrofili attivati	Degranulazione dei neutrofili e infiammazione	Vasculite
Sindrome di Goodpasture	Proteina diversa dal collagene della membrana basale dei glomeruli renali e degli alveoli polmonari	Infiammazione mediata dal complemento e dal recettore per Fc	Nefrite, emorragia polmonare
Febbre reumatica acuta	Antigene della parete cellulare dello streptococco; gli anticorpi cross-reagiscono con le proteine del miocardio	Infiammazione, attivazione dei macrofagi	Miocardite, artrite
Miastenia gravis	Recettore dell’acetilcolina	Gli anticorpi inibiscono il recettore dell’acetilcolina e l’espressione del recettore	Debolezza muscolare, paralisi
Morbo di Graves (ipertiroidismo)	Recettore del TSH	Stimolazione dei recettori del TSH mediata da anticorpi	Ipertiroidismo
Diabete insulino-resistente	Recettore per l’insulina	Gli anticorpi inibiscono il legame dell’insulina	Diabete mellito
Anemia perniciosa	Fattore intrinseco prodotto dalle cellule parietali gastriche	Neutralizzazione del fattore intrinseco,	Eritropoiesi anomala, anemia,

	diminuito assorbimento della vitamina B_{12}	sintomi neurologici

ANCA (*AntiNeutrophil Cytoplasmic Antibodies*), anticorpi anticitoplasma dei neutrofili; TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*), ormone stimolante la tiroide.

Malattie da immunocomplessi

Gli immunocomplessi in grado di causare malattie sono costituiti da anticorpi legati ad autoantigeni o ad antigeni non-self. Le caratteristiche patologiche di questo tipo di malattie dipendono dalla sede di deposizione degli immunocomplessi piuttosto che dall'origine cellulare dell'antigene. Tuttavia, le malattie da immunocomplessi si manifestano anche in modo sistemico, nonostante alcuni tessuti (come il rene e le articolazioni) siano piu predisposti di altri al danno locale.

L'esistenza delle malattie da immunocomplessi fu inizialmente ipotizzata all'inizio del '900 da un brillante medico, Clemens Von Pirquet. A quell'epoca, la difterite veniva trattata con siero prelevato da cavalli immunizzati con la tossina difterica, un tipico esempio di immunizzazione passiva. Grazie al suo acuto spirito d'osservazione, Von Pirquet notò che, nei pazienti che ricevevano siero di cavallo contenente antitossine, si sviluppavano infiammazioni articolari (artrite), eritema cutaneo e febbre. Due aspetti clinici di tali manifestazioni suggerivano che esse non fossero dovute all'infezione o a componenti tossici presenti nel siero. In primo luogo, questi sintomi comparivano anche dopo l'iniezione di siero di cavallo non immunizzato, per cui le lesioni non potevano essere attribuite all'anticorpo (antitossina). Inoltre, i sintomi comparivano almeno una settimana dopo la prima iniezione di siero e si presentavano sempre più rapidamente a ogni successivo inoculo. Von Pirquet concluse che questa malattia era dovuta a una risposta immunitaria dell'ospite a qualche componente del siero, ipotizzando che l'ospite producesse anticorpi in grado di formare complessi con le proteine di cavallo e che quindi la malattia fosse dovuta agli anticorpi stessi o agli immunocomplessi. Sappiamo ora che le sue conclusioni erano del tutto esatte. Von Pirquet chiamò questa patologia malattia da siero. La stessa reazione era stata osservata anche nei soggetti trattati con siero per il tetano. Si tratta di un problema che anche oggi si presenta in una percentuale di soggetti sottoposti a terapia con anticorpi

monoclonali prodotti a partire da topi o ratti immunizzati, o con antisieri policlonali utilizzati per il trattamento dei morsi di serpente o per la rabbia. Le manifestazioni sistemiche da immunocomplessi, anche quando non dipendono dall'iniezione di proteine estranee, condividono gli stessi meccanismi di danno tissutale della tipica malattia da siero.

Modelli sperimentali delle malattie da immunocomplessi

Malattia da siero

Molte delle attuali conoscenze sulle malattie da immunocomplessi si basano sull'analisi di modelli sperimentali della malattia da siero. L'immunizzazione di un coniglio con una dose elevata di un antigene proteico determina la formazione di anticorpi specifici (Fig. 19-4). Questi anticorpi si legano ad antigeni circolanti formando complessi, i quali vengono inizialmente rimossi dai macrofagi epatici e splenici. A mano a mano che i complessi antigene-anticorpo si formano, una quantità sempre maggiore si deposita però nel letto vascolare. Qui i complessi inducono un'infiammazione ricca di neutrofili, attivando la via classica del complemento e legando i recettori Fc dei leucociti. I complessi si depositano spesso a livello delle arteriole, dei glomeruli renali e delle sinovie articolari, e per questo le manifestazioni cliniche e patologiche più comuni sono costituite da vasculiti, nefriti e artriti. I sintomi clinici sono generalmente di breve durata e le lesioni si risolvono rapidamente, a meno che non venga nuovamente iniettato lo stesso antigene. Accanto a questo tipo di malattia acuta esiste una patologia più indolente e protratta, detta malattia cronica da siero, determinata da inoculi multipli di uno stesso antigene che provocano la formazione di immunocomplessi di dimensioni minori, i quali si depositano più frequentemente a livello del rene, delle arterie e dei polmoni.

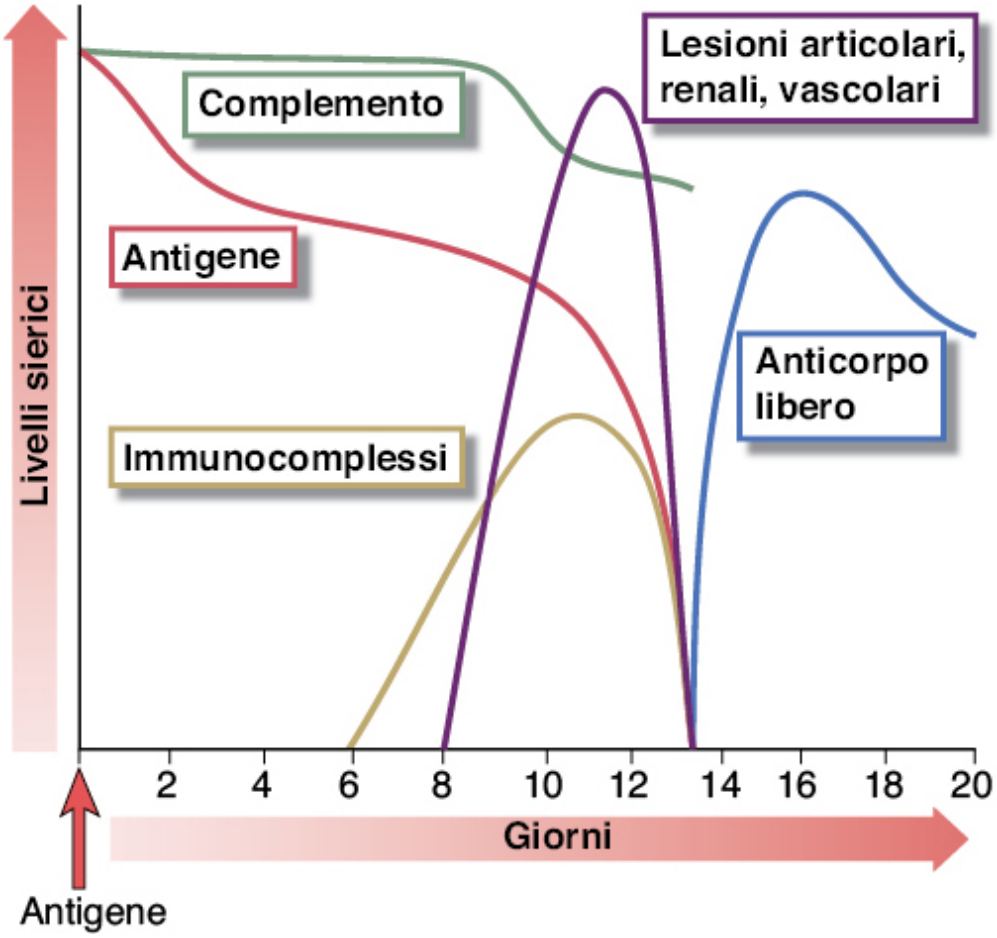


FIGURA 19-4 Sequenza delle risposte immunitarie nella malattia sperimentale acuta da siero. L'inoculo di albumina sierica bovina in un coniglio determina la produzione di anticorpi specifici e la formazione di immunocomplessi. Questi si depositano in vari tessuti, attivando il complemento (con diminuizione dei suoi livelli circolanti) e causando lesioni infiammatorie che si risolvono solo con la rimozione degli immunocomplessi e degli antigeni, quando gli anticorpi liberi (non complessati agli antigeni) cominciano ad apparire in circolo. (*Adattata da Cochrane CG: Immune complex – mediated tissue injury. In Cohen S, Ward PA, McCluskey RT [eds.]: Mechanisms of immunopathology, New York, 1979, Werbel & Peck, pp 29-48. Copyright © 1979, Wiley-Liss, Inc.*)

Reazione di Arthus

La reazione di Arthus è una forma localizzata di vasculite sperimentale da immunocomplessi, a seguito di inoculo sottocutaneo di un antigene in un animale precedentemente immunizzato oppure in un animale in cui siano stati somministrati per via endovenosa anticorpi specifici per l'antigene. Gli anticorpi circolanti si legano rapidamente all'antigene e formano immunocomplessi che si depositano a livello delle pareti delle arteriole nel sito di inoculo. Tale fenomeno provoca localmente una vasculite cutanea,

con trombosi dei vasi coinvolti e necrosi tissutale. La rilevanza clinica della reazione di Arthus è però limitata. Occasionalmente, un soggetto che riceve una dose iniziale di un vaccino può sviluppare infiammazione al sito di iniezione, a causa della deposizione locale di immunocomplessi, come in una reazione di Arthus. Questo modello, tuttavia, è largamente utilizzato per studiare le cellule e le molecole coinvolte nelle malattie da immunocomplessi.

Patogenesi delle malattie da immunocomplessi

L'entità di questo fenomeno è determinata dalla natura degli immunocomplessi e dalle caratteristiche dei vasi sanguigni. I complessi antigene-anticorpo si formano durante le normali risposte immunitarie, ma assumono rilevanza patologica solo quando sono prodotti in quantità eccessive o non vengono eliminati efficientemente, permettendo la loro deposizione a livello dei tessuti. Gli immunocomplessi di piccole dimensioni spesso non vengono fagocitati e tendono più facilmente a depositarsi nei vasi rispetto a quelli di misura maggiore. Gli immunocomplessi contenenti antigeni cationici si legano con elevata avidità ai componenti delle membrane basali dei vasi sanguigni e dei glomeruli renali caricati negativamente, producendo tipicamente un danno tissutale più grave e duraturo. I capillari all'interno dei glomeruli renali e delle sinovie sono siti in cui, passando attraverso queste membrane basali specializzate, il plasma è ultrafiltrato (per formare, rispettivamente, urina e liquido sinoviale). Tali tessuti rappresentano la sede preferenziale per la deposizione degli immunocomplessi. Gli immunocomplessi possono però depositarsi virtualmente in ogni tessuto a livello dei vasi sanguigni più piccoli. I depositi di anticorpi e di complemento sono identificabili nei vasi e, se l'antigene è noto, è possibile identificare anche le molecole di antigene all'interno dei depositi (Fig. 19-3, *B*).

Gli immunocomplessi depositati sulle pareti vascolari e nei tessuti attivano leucociti e mastociti, inducendo la produzione di citochine e di mediatori vasoattivi, che a loro volta possono facilitare la deposizione degli immunocomplessi, aumentando il flusso sanguigno e la permeabilità vascolare.

Nell'uomo, molte malattie sistemiche su base immunitaria sono causate dalla deposizione di immunocomplessi a livello vascolare (Tab. 19-3). Il lupus eritematoso sistemico (*Systemic Lupus Erythematosus*, SLE) è una malattia autoimmune in cui complessi formati da antigeni nucleari e anticorpi si depositano nei reni, nel circolo sistemico e nei tessuti. A questo riguardo, è interessante un tipo di vasculite mediata da immunocomplessi che interessa principalmente le arterie muscolari di medio calibro, definita poliartrite nodosa. In quasi il 50% dei casi, i complessi sono formati da anticorpi legati ad antigeni virali. Questa malattia può essere considerata una complicanza tardiva di infezioni virali e in modo particolare dal virus dell'epatite B. In maniera analoga, nella glomerulonefrite post-streptococcica i complessi formati da antigeni streptococcici e anticorpi si depositano nei glomeruli renali. In alcune forme di glomerulonefrite, gli immunocomplessi non si ritrovano in circolo, e ciò ha portato a postulare che gli antigeni si depositino nei reni prima ancora che si formino gli immunocomplessi.

TABELLA 19-3 Esempi di malattie umane mediate da immunocomplessi

Malattia	Antigene coinvolto	Manifestazioni clinicopatologiche
Lupus eritematoso sistemico	DNA, nucleoproteine, altri	Nefrite, artrite, vasculite
Poliarterite nodosa	Antigene di superficie del virus dell'epatite B (in alcuni casi)	Vasculite
Glomerulonefrite post-streptococcica	Antigeni della parete streptococcica	Nefrite
Malattia da siero	Proteine varie	Artrite, vasculite, nefrite

MALATTIE CAUSATE DAI LINFOCITI T

I linfociti T causano danno tissutale sia stimolando il processo infiammatorio sia eliminando direttamente le cellule bersaglio (Fig. 19-5). Le reazioni infiammatorie sono stimolate principalmente da linfociti T $CD4^+$ T_H1 e T_H17, che secernono citochine in grado di reclutare e attivare i leucociti. In alcune malattie mediate dai linfociti T, linfociti $CD8^+$ con attività citotossica (CTL) eliminano direttamente le cellule dell'ospite. I

linfociti T che causano danno tissutale possono essere autoreattivi o specifici per antigeni proteici non-self presenti all'interno di cellule o tessuti o a essi legati. Nel caso di infezioni croniche, il danno mediato da linfociti T è spesso proporzionale all'intensità e durata della risposta immunitaria, di per sé finalisticamente protettiva, contro i microrganismi persistenti (soprattutto patogeni intracellulari che resistono all'eliminazione da parte dei fagociti o anticorpi).

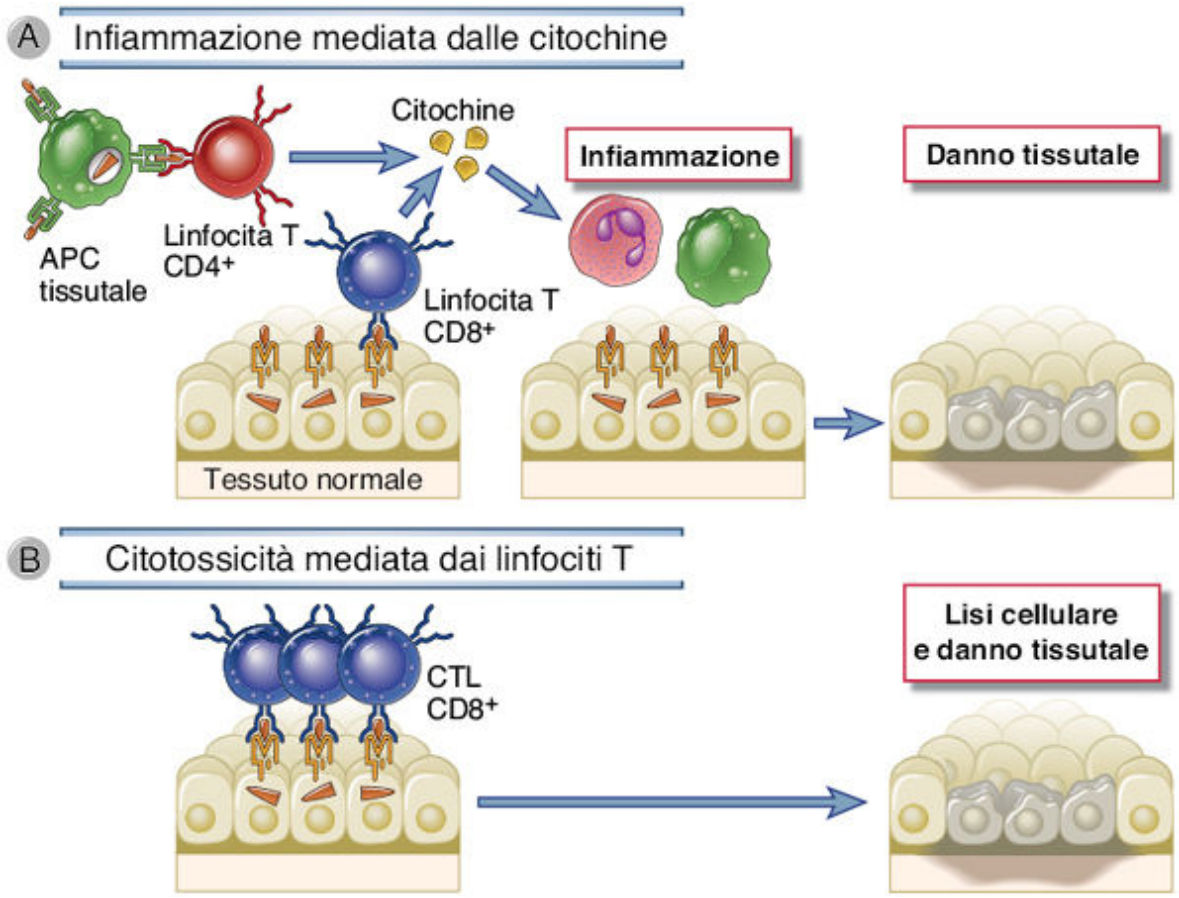


FIGURA 19-5 I meccanismi patogenetici delle malattie mediate da linfociti T. A. Nelle reazioni infiammatorie mediate da citochine, i linfociti T $CD4^+$ (e talvolta i $CD8^+$) rispondono agli antigeni tissutali producendo citochine infiammatorie che attivano i fagociti responsabili del danno tissutale. **B.** In alcune malattie, i linfociti T $CD8^+$. (CTL) uccidono le cellule dei tessuti. APC (*Antigen Presenting Cell*), cellula che presenta l'antigene.

La presenza di linfociti T a livello delle lesioni e la presenza nel sangue o nei tessuti di livelli aumentati di citochine, spesso secrete dai linfociti T, ha permesso di ipotizzare un ruolo patogenetico dei linfociti stessi in alcune

malattie su base immunitaria. I modelli animali sono stati di grande utilità per comprenderne la patogenesi.

Malattie causate da citochine proinfiammatorie

Nell'infiammazione immunomediata, i linfociti T_H1 e T_H17 secernono citochine che reclutano e attivano i leucociti. L'interleuchina-17 (IL-17), prodotta dai linfociti T_H17, promuove il reclutamento dei neutrofili; l'interferone-γ (IFN-γ), prodotto dai linfociti T_H1, attiva i macrofagi; il fattore di necrosi tumorale (*Tumor Necrosis Factor*, TNF) e le chemochine, prodotte dai linfociti T e da altre cellule, reclutano e attivano diversi tipi di leucociti. Sebbene sia spesso enfatizzato il ruolo dei linfociti T_H1 e T_H17 quale fonte primaria di queste citochine, molte altre cellule producono le stesse citochine a livello delle lesioni: alcuni modelli animali di infiammazione cutanea cronica, per esempio, hanno mostrato come la produzione di IL-17 nella fase precoce della malattia avvenga ad opera di linfociti T γδ.

Il danno tissutale è causato da sostanze prodotte dai neutrofili e da macrofagi che vengono reclutati e attivati, e liberano enzimi lisosomali, specie reattive dell'ossigeno, ossido nitrico e citochine proinfiammatorie (vedi Cap. 10). Le citochine proinfiammatorie sono anche in grado di promuovere l'espressione delle molecole MHC di classe II nelle cellule dell'endotelio vascolare dei tessuti coinvolti. Le malattie causate dai linfociti T si associano tipicamente a infiammazione cronica, anche se episodi ripetuti di infiammazione acuta possono manifestarsi nel decorso della malattia. L'ipersensibilità di tipo ritardato (*Delayed-Type Hypersensitivity*, DTH) è un esempio di questo tipo di reazione e verrà descritta più avanti in questo capitolo. Le reazioni infiammatorie croniche producono spesso una reazione fibrotica come risultato della secrezione di citochine e di fattori di crescita da parte dei macrofagi e dei linfociti T.

Molte malattie autoimmuni organo-specifiche sono causate dall'interazione dei linfociti T autoreattivi con autoantigeni, con rilascio di citochine che promuovono l'infiammazione. Si ritiene che questo rappresenti il principale meccanismo patogenetico nell'artrite reumatoide (AR), nella sclerosi multipla, nel diabete mellito di tipo 1, nella psoriasi e in

altre malattie autoimmuni (Tab. 19-4), alcune delle quali saranno descritte in maggiore dettaglio in questo capitolo.

TABELLA 19-4 Malattie mediate dai linfociti T

Malattia	Specificità dei linfociti T patogenetici	Principali meccanismi di danno tissutale
Artrite reumatoide	Collagene?	Infiammazione mediata dalle citochine T_H1 e T_H17
	Proteine self citrullinate?	Ruolo degli anticorpi e degli immunocomplessi?
Sclerosi multipla	Antigeni proteici mielinici (per es., proteina basica mielinica)	Infiammazione mediata dalle citochine T_H1 e T_H17 Degradazione della mielina da parte dei macrofagi attivati
Diabete mellito di tipo 1	Antigene delle cellule β delle isole pancreatiche (insulina, acido glutammico decarbossilasi, altre)	Infiammazione mediata dai linfociti T Distruzione delle cellule delle isole pancreatiche da parte dei CTL
Malattia infiammatoria intestinale	Batteri enterici Antigeni self?	Infiammazione mediata dalle citochine T_H17 e T_H1
Psoriasi	Antigeni cutanei sconosciuti	Infiammazione mediata da citochine prodotte dai linfociti T

Nella tabella sono riportati alcuni esempi di malattie mediate dai linfociti T. In molti casi la specificità dei linfociti T e i meccanismi del danno tissutale sono dedotti da modelli sperimentali su animali. Il ruolo dei linfociti T_H1 e T_H17 è dedotto dai modelli sperimentali e dalla presenza nelle lesioni sull'uomo di citochine specifiche per l'una o l'altra sottopopolazione. Oltre che dai linfociti T $CD4^+$, le citochine possono essere prodotte anche da altri linfociti. Le sperimentazioni cliniche attualmente in corso, aventi come target queste citochine, potrebbero fornire nuove informazioni in merito al loro contributo in diverse malattie.

Anche le risposte immunitarie mediate dai linfociti T specifiche per i microrganismi o altri antigeni non-self possono dare inizio all'infiammazione e al danno tissutale. I batteri intracellulari come *Mycobacterium tuberculosis* provocano potenti risposte da parte dei linfociti T e dei macrofagi. L'attivazione di queste cellule promuove l'infiammazione granulomatosa e la fibrosi (vedi più avanti), che determinano un esteso danno anatomico e funzionale, tipicamente a livello polmonare. La tubercolosi è un esempio di malattia infettiva in cui il danno tissutale è causato principalmente dalla risposta immunitaria dell'ospite (vedi Cap. 16).

Diverse malattie cutanee causate dall'esposizione locale a sostanze chimiche e antigeni ambientali, note come **sensibilità da contatto**, sono dovute a un'infiammazione presumibilmente in risposta a neoantigeni formati dall'associazione di sostanze chimiche ("apteni"; *N.d.T.*) con proteine self (che sono "aptenizzate", cioè modificate nel loro profilo antigenico per l'introduzione di neoepitopi; *N.d.T.*). Sia i linfociti $CD4^+$ sia i $CD8^+$ rappresentano un'importante fonte di citochine nelle reazioni di sensibilità da contatto. Ne sono esempi i rush cutanei causati dai veleni dell'edera velenosa o della quercia; in questi casi, i linfociti T reagiscono contro le proteine self modificate dai principi attivi di tali veleni (definiti *urusioli*). Gli stessi meccanismi patogenetici sono in gioco in seguito all'esposizione a metalli (nickel e berillio) e un ampio spettro di sostanze chimiche (come il tiurame, utilizzato nella produzione dei guanti di lattice). Quando queste risposte si cronicizzano prendono il nome di **eczema**. Si ritiene che le risposte dei linfociti T contro i batteri commensali intestinali possano costituire la causa di alcune forme di malattie infiammatorie intestinali.

La tipica **reazione infiammatoria mediata dai linfociti T** è la DTH, qui di seguito descritta.

Ipersensibilità di tipo ritardato

La DTH è una reazione infiammatoria lesiva mediata da citochine e sostenuta dall'attivazione dei linfociti T, in particolare dei CD4$^+$. La reazione è definita ritardata poiché si manifesta tipicamente nelle 24-48 ore successive alla riesposizione all'antigene, al contrario delle reazioni da ipersensibilità immediata (allergiche), che si manifestano nel giro di alcuni minuti (descritte nel Cap. 20).

Nel classico modello animale di DTH, una cavia viene immunizzata mediante somministrazione di un antigene proteico in presenza di un adiuvante; questa prima fase è denominata *fase di sensibilizzazione*. Dopo circa 2 settimane, all'animale viene nuovamente somministrato per via sottocutanea lo stesso antigene e la reazione che ne consegue viene misurata; questa fase è definita di stimolazione. L'uomo può sviluppare reazioni DTH in risposta a infezioni di origine microbica oppure in seguito a sensibilizzazione verso sostanze chimiche e antigeni ambientali con cui l'individuo è venuto in contatto. Anche l'inoculo per via intradermica o

sottocutanea di antigeni proteici induce DTH (Fig. 19-6). La successiva esposizione allo stesso antigene (che funge da antigene di richiamo) stimola la reazione immunitaria. Per esempio, il derivato proteico purificato di un antigene di *Mycobacterium tuberculosis* iniettato in individui che siano stati precedentemente esposti al micobatterio provoca una reazione DTH, definita reazione alla tubercolina. La risposta positiva al test cutaneo alla tubercolina viene usata clinicamente per diagnosticare un'infezione tubercolare attiva o pregressa.

FIGURA 19-6 Reazione di ipersensibilità di tipo ritardato. L'infezione o l'immunizzazione (vaccinazione) sensibilizza un individuo. Un successivo incontro con un antigene proveniente dallo stesso agente infettivo provoca una reazione di DTH, che si manifesta con indurimento, arrossamento ed edema in corrispondenza del sito di ingresso dell'antigene. La sintomatologia raggiunge il suo picco a 48 ore. (*Per gentile concessione del Dr. J. Faix, Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Palo Alto, California*.)

La caratteristica risposta DTH evolve nell'arco di 24-48 ore. Dopo circa 4 ore dalla somministrazione dell'antigene in un individuo sensibilizzato, i neutrofili si raccolgono attorno alle venule post-capillari del sito di iniezione. Entro circa 12 ore, nello stesso sito si accumulano anche i linfociti

T e i monociti reclutati dal circolo (Fig. 19-7). Le cellule endoteliali delle venule si rigonfiano, mostrano un aumento di organuli biosintetici e diventano permeabili alle macromolecole plasmatiche. Il fibrinogeno fuoriesce dai vasi sanguigni e passa nei tessuti circostanti, dove è convertito in fibrina. La deposizione di fibrina, l'edema e l'accumulo di linfociti T e di monociti nello spazio extravascolare determinano il rigonfiamento e l'indurimento del tessuto. Questa tumefazione, segno caratteristico della DTH, è evidenziabile entro circa 18 ore dall'iniezione dell'antigene e raggiunge la sua massima entità nelle 24-48 ore successive. Nella pratica clinica, la perdita di risposte DTH verso antigeni ubiquitari (per esempio gli antigeni di *Candida*) testimonia un deficit della funzionalità dei linfociti T, condizione nota come **anergia**. (Questa perdita di immunoresponsività è diversa dall'anergia clonale, un meccanismo cruciale per il mantenimento della tolleranza specifica per un antigene; vedi Cap. 15.)

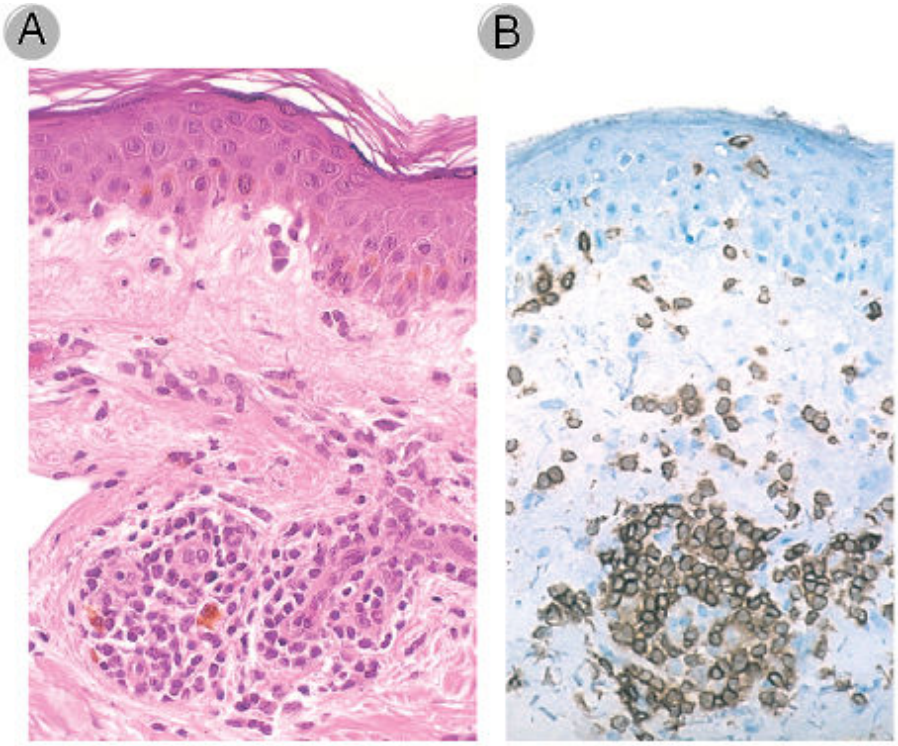


FIGURA 19-7 Morfologia di una reazione da ipersensibilità ritardata. A. L'esame istopatologico della reazione a livello cutaneo descritta nella Figura 19-6 evidenzia un infiltrato perivascolare dermico di cellule mononucleate. Con un maggiore ingrandimento (non mostrato in figura), si nota che l'infiltrato è costituito da linfociti e macrofagi attivati che circondano piccoli vasi sanguigni le cui cellule endoteliali mostrano una morfologia attivata. **B.** La colorazione immunoistochimica dimostra la presenza di molti linfociti T $CD4^+$ (*Per gentile concessione del Dr. J. Faix, Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Palo Alto, California.*)

Per quanto la risposta DTH sia da sempre considerata una reazione lesiva mediata dei linfociti T_H1, altri linfociti T possono contribuire alla reazione infiammatoria. Alcuni tipi di DTH sono caratterizzati dalla prominente presenza di neutrofili, suggerendo il coinvolgimento dei linfociti T_H17. Nelle infezioni da parte di alcuni elminti, la reazione contro le uova del parassita porta a una reazione di DTH con una forte componente di eosinofili. In questi casi è stato dimostrato anche un coinvolgimento delle citochine prodotte dai linfociti T_H2. Infine, anche i linfociti $CD8^+$ producono IFN-γ e possono contribuire a reazioni di DTH, specialmente della cute.

La cronicizzazione della DTH si sviluppa quando i macrofagi, attivati dai linfociti T_H1, non riescono a eliminare il microrganismo fagocitato. Se i microrganismi sono localizzati in un'area ristretta, la reazione produce dei noduli di tessuto infiammatorio definiti granulomi (Fig. 19-8, *A*). La reazione di DTH cronica, come ben esemplificato dalla reazione granulomatosa, è causata da abnormi e prolungati segnali generati dalla stimolazione da parte delle citochine (Fig. 19-8, *B*). In queste condizioni, i linfociti T attivati e i macrofagi continuano a produrre citochine e fattori di crescita, che amplificano la stimolazione di entrambi i tipi cellulari e modificano progressivamente il microambiente tissutale. Ne deriva un perpetuarsi del danno tissutale e della reazione di infiammazione cronica, a cui segue la deposizione di tessuto connettivo (fibrosi). Nel corso di DTH cronicizzate, i macrofagi attivati subiscono evidenti modificazioni morfologiche in risposta alle citochine che persistono nel microambiente infiammatorio: essi infatti presentano un aumento del citoplasma e degli organuli citoplasmatici e assumono una morfologia che ricorda quella delle cellule epiteliali cutanee; per tale ragione, vengono talvolta definiti cellule epitelioidi. I macrofagi attivati possono inoltre fondersi per formare cellule giganti plurinucleate. L'infiammazione granulomatosa rappresenta un tentativo di contenere l'infezione che però causa un significativo danno

anatomico, con conseguente compromissione funzionale del tessuto interessato. L'infiammazione granulomatosa è una caratteristica risposta verso alcuni microrganismi persistenti, come *M. tuberculosis* e alcuni funghi. Di fatto, buona parte della difficoltà respiratoria che si accompagna alla tubercolosi o a un'infezione micotica polmonare cronica non è direttamente attribuibile ai microrganismi, ma alla sostituzione del parenchima polmonare con tessuto fibrotico.

FIGURA 19-8 Infiammazione granulomatosa. A. L'esame istopatologico di un linfonodo di un paziente affetto da tubercolosi mostra un granuloma con macrofagi, cellule giganti plurinucleate e linfociti attivati. In alcuni granulomi si può avere una zona centrale di necrosi. Studi immunoistochimici identificherebbero i linfociti come cellule T. **B.** Meccanismi di formazione del granuloma. Le citochine contribuiscono allo sviluppo di linfociti T_H1, all'attivazione dei macrofagi e al reclutamento dei leucociti. Condizioni di questo genere, se persistenti, possono portare alla formazione del granuloma.

Malattie causate da linfociti T citotossici

La risposta dei CTL nei confronti delle cellule infettate dai virus può causare un danno tissutale, anche se il virus non è di per sé citopatico. La principale funzione dei CTL è eliminare i microrganismi intracellulari, primi fra tutti i virus, uccidendo le cellule infettate. Alcuni virus danneggiano direttamente la cellula che hanno infettato e per questo motivo vengono definiti citopatici, mentre altri non svolgono questa azione. I CTL non sono in grado di distinguere a priori i virus citopatici da quelli che non lo sono e quindi uccidono le cellule infettate a prescindere dal fatto che l'infezione sia o meno pericolosa per l'ospite. Tipici esempi di infezioni virali in cui le lesioni sono dovute alla risposta dei CTL e non al virus sono la coriomeningite linfocitica murina e alcune forme di epatite virale nell'uomo (vedi Cap. 16).

I CTL sembrerebbero contribuire al danno tissutale in quelle malattie autoimmuni dove la distruzione di alcune particolari cellule dell'ospite è il fattore patogenetico primario, come nel diabete di tipo 1 in cui sono uccise le cellule β delle isole pancreatiche che producono insulina.

APPROCCI TERAPEUTICI ALLE MALATTIE SU BASE IMMUNITARIA

Tra i più importanti risultati conseguiti recentemente dall'immunologia si annoverano lo sviluppo e l'impiego di nuove terapie per le malattie su base immunitaria, fatto questo che consegue ad una migliore comprensione della loro patogenesi (Fig. 19-9). Queste terapie possono essere classificate in diversi gruppi.

FIGURA 19-9 Nuove terapie per le malattie infiammatorie che colpiscono le risposte dei linfociti T. La figura illustra i livelli di azione di alcuni agenti di recente sviluppo in grado di bloccare componenti delle risposte immunitarie. Molti di questi agenti hanno come bersaglio le citochine e i loro recettori. Anche l'eliminazione dei linfociti B da parte di anticorpi anti-CD20 può contribuire a ridurre le risposte patologiche dei linfociti T (non mostrato in figura).

Agenti antinfiammatori

Per molti anni, il trattamento di elezione delle malattie da ipersensibilità si è basato sull'utilizzo di farmaci antinfiammatori, soprattutto i corticosteroidi. Questi farmaci inibiscono la secrezione di citochine e di altri mediatori dell'infiammazione, riducendo di conseguenza l'infiammazione associata all'immunopatologia.

Eliminazione dei meccanismi effettori dell'immunità: cellule e anticorpi

A oggi diversi tipi di anticorpi monoclonali – in grado di eliminare le cellule linfoidi *in toto*, oppure i linfociti T o B in modo specifico – sono utilizzati per il trattamento delle malattie infiammatorie gravi. Nel Capitolo 5 è disponibile un elenco degli anticorpi utilizzati nella pratica clinica (vedi Tab. 5-3). Un recente sviluppo di questi reagenti è l'utilizzo dell'anticorpo anti-CD20 (rituximab) che, nonostante agisca in modo selettivo sui linfociti B, si è dimostrato efficace nel trattamento di malattie che si ritiene siano causate principalmente dall'infiammazione causata dai linfociti T, come per esempio l'artrite reumatoide (AR), la sclerosi multipla, e una serie di altri disturbi autoimmuni. L'efficacia dell'anticorpo anti-CD20 è riconducibile al ruolo dei linfociti B nelle risposte dei linfociti T, in modo particolare alla

generazione e al mantenimento dei linfociti T della memoria. La plasmaferesi rappresenta invece il sistema elettivo per la rimozione degli anticorpi e degli immunocomplessi circolanti.

TABELLE 19-5 Esempi di antagonisti delle citochine in corso di sperimentazione clinica

Citochina o suo recettore colpiti	Effetti biologici attesi	Indicazioni cliniche
TNF	Inibizione della migrazione dei leucociti nel sito di infiammazione	Artrite reumatoide, psoriasi, malattia infiammatoria intestinale
IL-1	Inibizione della migrazione dei leucociti nel sito di infiammazione	Rare sindromi autoinfiammatorie, gotta severa, artrite reumatoide
IL-6 e recettore per l'IL-6	Inibizione dell'infiammazione, risposte anticorpali?	Artrite idiopatica giovanile, artrite reumatoide
IL-17	Inibizione del reclutamento dei leucociti al sito di infiammazione	Psoriasi, forse artrite reumatoide (sperimentazione in corso)
Catena p40 dell'IL-12 e IL-23	Inibizione delle risposte T_H1 e T_H17	Malattia infiammatoria intestinale, psoriasi
Recettore dell'IL-2 (CD25)	Inibizione della proliferazione dei linfociti T	Rigetto acuto del trapianto
IFN-α	Probabili effetti sulla differenziazione dei linfociti T_H1, produzione di anticorpi	Lupus eritematoso sistemico (LES)
IL-4/IL-13	Inibizione della differenziazione e della funzione dei linfociti T_H2, produzione di IgE	Asma
BAFF	Riduzione della sopravvivenza dei linfociti B	Lupus eritematoso sistemico

Nella tabella sono riportati alcuni esempi di antagonisti delle citochine (anticorpi o recettori solubili) che sono stati approvati per l'uso clinico o che sono in corso di sperimentazione. IFN, interferone; IL, interleuchina; TNF (*Tumor Necrosis Factor*), fattore di necrosi tumorale.

Terapie anticitochine

Sono oggi disponibili antagonisti in grado di inibire in modo specifico un ampio spettro di citochine e i loro recettori coinvolti nella risposta

infiammatoria. Questi composti vengono utilizzati nel trattamento di malattie infiammatorie croniche che dipendono dall'azione dei linfociti T (Tab. 19-5). Il primo successo terapeutico ottenuto con i farmaci biologici è rappresentato dall'impiego di una forma solubile del recettore per il TNF e di anticorpi anti-TNF: entrambe le strategie permettono di legare e neutralizzare questa citochina. Questi agenti hanno dimostrato un'elevata risposta terapeutica in pazienti affetti da AR, morbo di Crohn e, a livello cutaneo, nella psoriasi. Gli anticorpi per il recettore di IL-6 sono stati impiegati con successo nelle sperimentazioni sull'artrite reumatoide giovanile e dell'età adulta. Antagonisti di altre citochine proinfiammatorie, come l'IL-1, la subunità p40 (presente sia nell'IL-12 sia nell'IL-23), l'IL-6, l'IL-17 e altre, sono già stati approvati per l'utilizzo clinico o sono attualmente in fase avanzata di sperimentazione.

Farmaci che inibiscono le interazioni cellulari e la migrazione leucocitaria

Alcuni agenti che bloccano le molecole costimolatorie B7 sono stati approvati come trattamento per l'AR e il rigetto di trapianti d'organo. Anticorpi anti-integrine sono stati utilizzati per inibire la migrazione dei leucociti nei tessuti, in particolare nel sistema nervoso centrale, in pazienti con sclerosi multipla; una complicanza rara ma grave della terapia con questo anticorpo sarà descritta più avanti nel corso del capitolo, nell'ambito della discussione sulla sclerosi multipla. Gli anticorpi anti-CD40 bloccano l'attivazione dei linfociti B e dei macrofagi mediata dai linfociti T, e sono di beneficio in pazienti affetti da sclerosi multipla e da malattia intestinale infiammatoria, anche se alcuni soggetti sviluppano complicanze trombotiche; la causa di questo effetto collaterale è probabilmente da ricercare nell'espressione di CD40 da parte delle piastrine umane, dove peraltro svolge una funzione non ancora nota.

Somministrazione endovenosa di IgG

La somministrazione di dosi elevate di IgG per via endovenosa (*IntraVenous ImmunoGlobulin*, IVIG) mostra benefici terapeutici in alcune malattie da ipersensibilità. Non è chiaro come questi agenti possano sopprimere la risposta infiammatoria; una possibilità è che le IgG leghino il recettore inibitorio per Fc (FcγRIIB) espresso dai macrofagi e dai linfociti B (vedi

Cap. 12). La IVIG potrebbe inoltre ridurre l'emivita degli anticorpi patogenetici competendo per il legame al recettore per Fc neonatale (*Neonatal Fc Receptor*, FcRn), che negli adulti protegge gli anticorpi dalla degradazione (vedi Cap. 5).

Terapie che utilizzano linfociti T regolatori

Di recente si è mostrato grande interesse verso la possibilità di utilizzare linfociti T regolatori (Treg) per il trattamento delle malattie infiammatorie. Numerose sperimentazioni cliniche sono attualmente in corso atte a purificare Treg dai pazienti, espanderli e attivarli in coltura, per poi trasferirli nuovamente nei donatori. Un altro approccio prevede il trattamento del paziente con basse dosi di IL-2, che si ipotizza attivi ed espanda le cellule Treg a discapito degli effettori patogenetici.

Sono in fase di studio anche trattamenti più specifici, come quelli potenzialmente in grado di indurre tolleranza clonale nel comparto cellulare T. La sclerosi multipla e il diabete di tipo 1 sono due malattie su base immunitaria nelle quali è stato identificato l'antigene bersaglio (rispettivamente, i peptidi della proteina basica della mielina e l'insulina); per entrambe queste malattie è in corso la sperimentazione di trattamenti che inducano tolleranza antigene-specifica nei linfociti T. Un rischio comunque associato a trattamenti che blocchino in modo aspecifico la risposta immunitaria è rappresentato dalla possibilità di interferire con le normali funzioni di difesa, rendendo i pazienti più suscettibili alle infezioni. L'induzione di una tolleranza specifica dovrebbe, pertanto, evitare questo rischio ed eliminare selettivamente la popolazione linfocitaria patogenetica. Questi principi sono simili a quelli su cui si basano le strategie per il trattamento del rigetto del trapianto (vedi Cap. 17).

PATOGENESI E STRATEGIE TERAPEUTICHE PER ALCUNE MALATTIE SU BASE IMMUNITARIA

Prenderemo ora in esame i meccanismi patogenetici di alcune malattie causate da anticorpi o da linfociti T e il relativo impiego di nuove strategie terapeutiche, allo scopo di illustrare in modo più dettagliato i principi enunciati precedentemente.

Lupus eritematoso sistemico (LES) come prototipo di malattia da immunocomplessi

Il LES è una patologia autoimmune cronica multisistemica con fasi di remissione e riacutizzazione che colpisce prevalentemente le donne (il rapporto femmine/maschi è 10:1), con un'incidenza negli Stati Uniti di 1 caso ogni 700 donne di età compresa tra 20 e 60 anni (1 su 250 nelle donne di colore). Le sue principali manifestazioni cliniche sono il rash cutaneo, l'artrite e la glomerulonefrite, ma sono anche frequenti l'anemia emolitica, la trombocitopenia e i disturbi del sistema nervoso centrale. Nei pazienti affetti da LES si riscontrano autoanticorpi, frequentemente antinucleo (e in particolare anti-DNA) o diretti contro ribonucleoproteine, istoni e antigeni nucleari. Gli immunocomplessi, formati dagli autoanticorpi e dai loro antigeni, sono responsabili della glomerulonefrite, dell'artrite e della vasculite che coinvolgono le piccole arterie in modo sistemico. L'anemia emolitica e la trombocitopenia sono invece dovute agli autoanticorpi diretti rispettivamente contro gli eritrociti e le piastrine. Il principale indice diagnostico per il LES è la presenza nel siero di anticorpi antinucleo, in particolare quelli diretti contro il DNA nativo a doppia elica che rappresentano un elemento distintivo del LES.

Patogenesi del lupus eritematoso sistemico

Il LES è una malattia complessa nella quale i fattori genetici e ambientali contribuiscono alla perdita della tolleranza dei linfociti B e T autoreattivi. Tra i fattori genetici si annoverano l'ereditarietà di alcuni alleli HLA e la propensione a sviluppare il LES (misurata come rischio relativo o *odds ratio*) è 2-3 volte maggiore negli individui che esprimono HLA-DR2 o HLA-DR3 e raggiunge le 5 volte nei soggetti che esprimono entrambi gli aplotipi. Nel 5% circa dei pazienti si osserva un deficit a carico delle proteine della via classica del complemento, in particolare dei fattori C1q, C2 e C4. Tali deficit potrebbero essere la causa sia dell'insufficiente

eliminazione degli immunocomplessi e delle cellule apoptotiche sia della perdita della tolleranza nei linfociti B. In alcuni pazienti è stato anche descritto un particolare polimorfismo nel gene che codifica per il recettore per Fc inibitorio FcγRIIB; questo potrebbe contribuire all'inadeguato controllo dell'attivazione dei linfociti B e delle cellule dell'immunità innata. Altri geni potenzialmente coinvolti nell'insorgenza del LES sono stati individuati mediante studi di associazione genomica e il ruolo di alcuni di questi, come il PTPN22, è trattato nel Capitolo 15. Sono state identificare inoltre mutazioni a carico di TREX1, discusse più avanti. Tra i fattori ambientali si annoverano l'esposizione ai raggi ultravioletti, che si presume possa causare la morte per apoptosi delle cellule, con conseguente rilascio di antigeni nucleici.

Due osservazioni hanno portato alla formulazione di nuove ipotesi relative alla patogenesi del LES. Alcuni studi hanno rivelato che i leucociti circolanti dei pazienti affetti da questa malattia possiedono un preciso profilo molecolare (che a sua volta sottintende un altrettanto preciso profilo di espressione genica) che riconduce all'azione dell'IFN-α, un IFN di tipo 1 prodotto principalmente da cellule dendritiche plasmacitoidi. Questi studi sono supportati da altri che evidenziano l'effettiva produzione di abnormi quantità di IFN-α da parte dei leucociti isolati dai pazienti con il LES. Parallelamente, modelli animali hanno dimostrato che i recettori Toll-like (*Toll-Like Receptors*, TLR) in grado di riconoscere il DNA e l'RNA (in particolare il TLR9 che riconosce il DNA e il TLR7 che riconosce l'RNA) svolgono un importante ruolo nell'attivazione dei linfociti B specifici per gli autoantigeni nucleari. Sulla base di queste scoperte è stato proposto un nuovo modello patogenetico (Fig. 19-10), secondo il quale l'esposizione ai raggi ultravioletti (o altre *noxae* di origine ambientale) porta all'apoptosi cellulare, seguita dall'inadeguata rimozione dei nuclei apoptotici (dovuta almeno in parte a difetti dei meccanismi preposti, come le proteine del complemento e le nucleasi quali TREX1) e all'accumulo di autoantigeni nucleari. I polimorfismi dei geni che predispongono al LES determinano l'incapacità di mantenere la tolleranza da parte dei linfociti B e T, permettendo la persistenza dei cloni autoreattivi. La perdita della tolleranza dei linfociti B può anche essere dovuta a difetti nell'editing dei recettori o nell'eliminazione dei linfociti B immaturi a livello midollare, oppure a inadeguata tolleranza periferica.

FIGURA 19-10 Modello patogenetico del lupus eritematoso sistemico (LES). In questo modello, vari geni predisponenti interferiscono con i meccanismi di mantenimento della tolleranza al self, mentre stimoli esogeni determinano la formazione e la persistenza di autoantigeni nucleari. Questo comporta una risposta anticorpale verso gli autoantigeni nucleari amplificata dall'attivazione TLR-dipendente delle cellule dendritiche e dei linfociti B specifici per gli acidi nucleici e dalla produzione di IFN di tipo I. DC (*Dendritic Cells*), cellule dendritiche.

I linfociti B autoreattivi vengono quindi stimolati a produrre anticorpi verso gli antigeni nucleari. Questi immunocomplessi vengono internalizzati nell'endosoma in seguito al loro legame al recettore per Fc espresso dalle cellule dendritiche o al recettore per l'antigene dei linfociti B. Gli acidi nucleici possono legare i TLR endosomiali inducendo la produzione di autoanticorpi possono stimolare le cellule dendritiche (in particolare quelle plasmacitoidi) a produrre IFN-α, in grado a sua volta di amplificare ulteriormente la risposta e di potenziare i meccanismi apoptotici. Ne deriva un ciclo vizioso in cui il rilascio di antigeni e l'attivazione immunitaria portano alla produzione di autoanticorpi con affinità sempre maggiore.

Nuove terapie nel lupus eritematoso sistemico

I recenti progressi nella conoscenza del LES stanno portando a nuovi approcci terapeutici. A tale riguardo sono in corso sperimentazioni cliniche per valutare l'efficacia dell'utilizzo di anticorpi anti-IFN-α e si sta prendendo in considerazione anche la possibilità di interferire con i sistemi di trasduzione dei TLR. È in corso di valutazione anche l'ipotesi di utilizzare anticorpi anti-CD20 per eliminare i linfociti B autoreattivi. Infine, un anticorpo in grado di bloccare la proteina BAFF (un fattore di crescita per i linfociti B) è stato recentemente approvato per il trattamento del LES. Le sperimentazioni cliniche finalizzate all'eliminazione dei linfociti B tramite anticorpi anti-CD20 o anti-BAFF hanno avuto un successo limitato. Sebbene l'approccio che prevede l'eliminazione dei linfociti B non sia stato abbandonato, nuovi approcci terapeutici sono necessari.

Artrite reumatoide

L'artrite reumatoide (AR) è una patologia infiammatoria che coinvolge sia le piccole articolazioni delle estremità (in particolare quelle delle dita delle mani e dei piedi, e i polsi) sia le articolazioni di dimensioni maggiori (spalle,

ginocchia e caviglie). Questa malattia è caratterizzata da un'infiammazione della sinovia associata alla distruzione della cartilagine articolare e dell'osso, con un quadro anatomopatologico che suggerisce la presenza di una risposta immunitaria locale. Allo sviluppo della sinovite contribuiscono sia le risposte cellulo-mediate sia quelle umorali. Nella sinovia infiammata si riscontra la presenza di linfociti $CD4^+$ con fenotipo T_H1 o T_H17^+, linfociti B attivati, plasmacellule e macrofagi e di altri tipi di cellule infiammatorie e, nei casi più gravi, possono essere presenti follicoli linfatici ben formati dotati di centri germinativi (i cosiddetti organi linfoidi terziari). Nel liquido sinoviale (articolare) sono presenti numerose citochine, tra cui IL-1, IL-8, TNF, IL-6, IL-17 e IFN-γ. Si ritiene che queste citochine stimolino il reclutamento dei leucociti (i cui prodotti possono causare danno tissutale) e attivino le cellule sinoviali residenti a produrre enzimi proteolitici (come le collagenasi), anch'esse in grado di provocare la distruzione della cartilagine, dei legamenti e dei tendini. Infine, anche un'aumentata attività degli osteoclasti contribuisce al danno osseo riscontrabile nelle articolazioni in corso di AR. Ciò potrebbe essere causato dalla produzione da parte dei linfociti T attivati di una proteina della famiglia del TNF definita ligando di RANK (*Receptor Activator of Nuclear Factor κB*). Questa proteina attiva e induce la differenziazione dei precursori degli osteoclasti legandosi al recettore RANK, un membro della famiglia dei recettori del TNF. Le complicanze sistemiche dell'AR consistono in vasculite, presumibilmente causata da immunocomplessi, e danno polmonare.

Nonostante fino a oggi l'enfasi sia stata posta sul ruolo dei linfociti T nell'AR, anche gli anticorpi potrebbero contribuire al danno articolare. Infatti, i linfociti B attivati e le plasmacellule sono frequentemente presenti a livello delle sinovie delle articolazioni colpite. Inoltre, i pazienti affetti da AR presentano spesso IgM o IgG circolanti dirette verso le porzioni Fc (o più raramente Fab) delle loro stesse IgG. Questi autoanticorpi prendono il nome di fattori reumatoidi e la loro presenza viene utilizzata come parametro diagnostico. Per quanto i fattori reumatoidi possano partecipare alla formazione di immunocomplessi, il loro preciso ruolo patogenetico non è noto. Un'altra specificità anticorpale riscontrabile in almeno il 70% dei pazienti è quella verso peptidi ciclici contenenti residui di citrullina (*Cyclic Citrullinated Peptides*, CCP) derivati da alcune proteine che, in ambiente infiammatorio, vengono modificate mediante la conversione enzimatica dei

residui di arginina in citrullina. Gli anticorpi anti-CCP rappresentano degli indici diagnostici e potrebbero essere coinvolti nel danno tissutale.

Patogenesi dell'artrite reumatoide

Come in altre malattie autoimmuni, anche nell'AR i fattori genetici e ambientali contribuiscono alla perdita della tolleranza verso gli autoantigeni. Le caratteristiche specifiche dei linfociti B e T patogenetici rimangono tuttora non chiare, sebbene siano stati identificati linfociti B e T che riconoscono peptidi citrullinati. La predisposizione a sviluppare AR è legata all'espressione dell'aplotipo HLA-DR4. Inoltre, recenti studi di associazione genomica hanno permesso di identificare un numero elevato di polimorfismi genici associati ad AR. In particolare, esiste un'associazione tra la malattia e il gene che codifica per la tirosina fosfatasi PTPN22, come discusso nel Cap. 15.

L'identificazione di anticorpi anti-CCP ha portato alla formulazione di nuove ipotesi in merito alla patogenesi dell'AR (Fig. 19-11). L'attuale modello prevede che le lesioni causate dagli insulti ambientali (come il fumo e alcune infezioni) inducano la sostituzione dei residui di arginina con citrullina nelle proteine self. Negli individui geneticamente suscettibili, la mancanza di tolleranza innescherebbe le risposte anticorpali e l'attivazione dei linfociti T verso queste neoproteine antigeniche che, se presenti nelle articolazioni, porterebbe a un danno tissutale locale. I linfociti T_H17 e forse anche i T_H1 secernono citochine che reclutano i leucociti nell'articolazione e attivano le cellule sinoviali a produrre collagenasi e altri enzimi litici. Questo processo porta alla progressiva erosione della cartilagine e dell'osso. La cronicizzazione delle risposte a livello articolare può inoltre portare alla formazione di tessuto linfoide terziario a livello della membrana sinoviale, che perpetuano e propagano la reazione infiammatoria locale.

FIGURA 19-11 Modello patogenetico dell'artrite reumatoide. Secondo il modello qui illustrato, negli individui predisposti geneticamente, gli stimoli ambientali inducono la citrullinazione di proteine self e l'attivazione di una risposta autoreattiva da parte dei linfociti T e B. Gli anticorpi prodotti e i linfociti T invadono le giunzioni articolari, reagiscono contro le proteine self modificate e causano un danno tissutale, principalmente attraverso la secrezione di citochine e probabilmente anche attraverso meccanismi effettori anticorpo-dipendenti. Anche altre alterazioni delle proteine self, diverse dalla citrullinazione, possono causare gli stessi effetti.

Nuove terapie nell'artrite reumatoide

Il riconoscimento del ruolo centrale svolto dai linfociti T e delle citochine da loro prodotte ha apportato un significativo progresso nella messa a punto di nuove terapie nelle quali vengono colpite specifiche molecole coinvolte nella malattia. Tra questi nuovi farmaci, i più promettenti sono gli antagonisti del TNF che, in molti pazienti, hanno radicalmente modificato il decorso della malattia portandola da una progressiva e irreversibile distruzione delle articolazioni a una controllata infiammazione cronica. Negli ultimi 5-10 anni sono state sviluppate diverse terapie alternative, che hanno permesso di espandere la conoscenza della patogenesi della malattia. Il blocco delle citochine, oltre al TNF, si è rivelato efficace; tra questi ricordiamo un anticorpo che blocca il recettore di IL-6, un antagonista di IL-1, nonché una piccola molecola in grado di inibire la via di trasduzione di JAK (un importante mediatore intracellulare attivato da molti recettori di citochine). L'inibizione dell'attivazione dei linfociti T è stata possibile grazie al blocco della costimolazione B7:CD28 con CTLA-4-Ig, una proteina di fusione, risultante dal dominio extracellulare di CTLA-4 e dalla porzione Fc delle IgG, che lega B7 (vedi Cap. 9). Anche l'eliminazione dei linfociti B con anticorpi anti-CD20 si è rivelata efficace, sebbene i meccanismi coinvolti non siano completamente chiari.

Sclerosi multipla

La sclerosi multipla (SM) è una malattia autoimmune del sistema nervoso centrale in cui i linfociti T $CD4^+$ T_H1 e/o T_H17 reagiscono contro gli antigeni self della mielina causando neuroinfiammazione con attivazione dei macrofagi presenti attorno alle fibre nervose intracraniche e del midollo spinale. Ciò porta alla degradazione della mielina e quindi ad anomalie della conduzione nervosa, con conseguente deficit neurologico. La SM rappresenta la patologia neurologica a incidenza più elevata negli adulti di giovane età. All'esame istologico, essa si presenta con un quadro infiammatorio a livello della sostanza bianca e demielinizzazione secondaria. Dal punto di vista clinico, la malattia esordisce con debolezza fisica, per poi progredire con paralisi e disturbi oculari caratterizzati da remissioni e riacutizzazioni. Nei pazienti con malattia attiva è possibile

evidenziare, attraverso la diagnostica per immagini, la progressiva formazione di nuove lesioni neurologiche.

L'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAS) è una malattia organo-specifica mediata esclusivamente dai linfociti T e rappresenta probabilmente il modello sperimentale meglio caratterizzato della SM. L'EAS viene indotta immunizzando animali con antigeni mielinici, come la proteina basica della mielina, la proteina proteolipidica e la glicoproteina degli oligodendrociti della mielina, in associazione a un adiuvante contenente micobatteri inattivati, necessario per indurre una forte risposta dei linfociti T. A distanza di 1-2 settimane dall'immunizzazione, gli animali sviluppano un'encefalomielite caratterizzata da un infiltrato perivascolare della sostanza bianca costituito da linfociti e macrofagi, cui fa seguito la demielinizzazione. Le lesioni neurologiche possono essere lievi e autolimitanti o croniche e progressive. A loro volta, queste lesioni possono manifestarsi come paralisi progressiva o con fasi di remissioni e riacutizzazioni. La malattia può essere trasferita ad animali sani attraverso linfociti T isolati da quelli malati. Sono stati identificati sia nell'uomo sia nel topo anticorpi specifici per gli antigeni di origine mielinica, tuttavia il loro significato patologico non è stato ancora chiarito.

Patogenesi della sclerosi multipla

Molteplici evidenze sperimentali hanno dimostrato che nel topo l'EAS è causata dai linfociti $CD4^+$, T_H1 e T_H17, specifici per la mielina. Sulla base dell'identificazione di linfociti T_H1 e T_H17 specifici, si pensa che anche nell'uomo la SM sia causata da cloni T specifici per la mielina. Rimane comunque da comprendere la modalità attraverso cui queste cellule vengono attivate nel corso della malattia. È stato suggerito che un'infezione, verosimilmente di origine virale, possa attivare i linfociti T autoreattivi verso gli antigeni della mielina attraverso un meccanismo di mimetismo molecolare (vedi Cap. 15), mentre la rottura della tolleranza verso il self potrebbe essere causata della presenza di geni predisponenti. I gemelli omozigoti hanno una probabilità del 25-30% di sviluppare la SM, mentre nei gemelli eterozigoti la probabilità è del 6%. Queste osservazioni implicano la presenza di fattori genetici nello sviluppo della malattia, ma indicano anche che questi possono solo contribuire a parte del rischio. I polimorfismi

genetici associati alla SM includono il locus HLA (principalmente HLA-DRB1*1501). Studi di associazione genetica e altre analisi genetiche hanno messo in luce oltre 100 varianti genetiche che contribuiscono al rischio per la malattia; la maggior parte di queste corrisponde a geni coinvolti nelle funzioni immunitarie. Un'associazione interessante riguarda un polimorfismo nella regione non codificante di CD25, il gene che codifica la catena α del recettore IL-2. Tale polimorfismo potrebbe alterare la generazione e la sopravvivenza dei linfociti T effettori e/o regolatori. Altri studi hanno suggerito che nella SM la persistenza a livello periferico dei linfociti T sia difettoso, ma anche in questo caso rimane da spiegare come questo possa contribuire alla rottura della tolleranza. Una volta attivati, i linfociti T specifici migrano nell'SNC, dove si attivano in seguito al riconoscimento della mielina e rilasciano citochine in grado di reclutare e attivare i macrofagi e i linfociti T, che portano alla distruzione della mielina. Studi sull'EAS murina suggeriscono che la malattia possa essere propagata attraverso un processo noto come **diffusione degli epitopi** (*epitope spreading*) (vedi Cap. 15). In questo caso, il danno tissutale porterebbe a una liberazione anomala di antigeni proteici (precedentemente sequestrati all'interno delle cellule) con esposizione di nuovi epitopi che attivano linfociti T autoreattivi.

Nuove terapie nella sclerosi multipla

In passato, l'immunoterapia per la SM si è basata su approcci empirici, il cui meccanismo d'azione non era ben compreso a livello scientifico. Questi comprendono la somministrazione di IFN-α, che potrebbe alterare la risposta ad altre citochine, e il trattamento con un polimero formato da quattro aminoacidi in sequenza casuale, che si pensa possa legarsi alle molecole HLA bloccando la presentazione dell'antigene. Di recente, tuttavia, sono state sviluppate nuove terapie in grado di modulare le risposte immunitarie. Una di queste è costituita da un anticorpo contro l'integrina VLA-4 (vedi Cap. 3), che blocca il reclutamento leucocitario e che ha mostrato portare beneficio ai pazienti; è tuttavia da notare che in una piccola percentuale di pazienti il trattamento ha determinato la riattivazione di un'infezione latente del virus JC che causa una grave e a volte fatale malattia neurologica. Anche un altro farmaco, definito fingolimod (FTY720), recentemente approvato per

la terapia della SM, interferisce con la migrazione dei leucociti. L'FTY720 blocca il processo di migrazione dei linfociti T dagli organi linfoidi secondari a opera della sfingosina-1-fosfato (vedi Cap. 3). Anche la soppressione dei linfociti B tramite l'anticorpo anti-CD20 è efficace. Questi risultati suggeriscono il ruolo fondamentale dei linfociti B, probabilmente come APC, nell'attivazione dei linfociti T patogenici. Dato che un antigene self, la proteina basica della mielina (*Myelin Basic Protein*, MBP) costituisce il bersaglio della risposta immunitaria nella SM, grandi speranze sono riposte nella possibilità di somministrare peptidi correlati alla MBP al fine di indurre una tolleranza antigene-specifica o per generare linfociti T regolatori specifici. Colpisce anche il fatto che la maggior parte delle terapie siano efficaci nei primi stati della SM, caratterizzata da infiammazione, ma non nelle fasi di evoluzione della malattia, caratterizzata da neurodegenerazione, la principale causa di disabilità permanente. Queste osservazioni hanno portato a nuovi tentativi di ripristinare la mielinazione e di riparare gli assoni e i neuroni danneggiati.

Diabete mellito di tipo 1

Il diabete mellito di tipo 1, precedentemente noto come *diabete* mellito insulino-dipendente, è una malattia metabolica multisistemica causata da un alterato metabolismo dell'insulina che colpisce circa lo 0,2% della popolazione negli Stati Uniti, con un picco all'età di 11-12 anni. L'incidenza della malattia sembra essere in crescita nel Nord America e in Europa. La malattia si manifesta con iperglicemia e chetoacidosi, mentre le sue complicanze croniche includono l'aterosclerosi progressiva delle arterie (che può determinare la necrosi ischemica degli arti e degli organi interni) e l'ostruzione microvascolare con conseguente danno alla retina, ai glomeruli renali e ai nervi periferici. I pazienti presentano una carenza di insulina dovuta alla distruzione immunomediata delle cellule β delle isole di Langerhans nel pancreas e necessitano di una terapia sostitutiva continua con insulina. In genere si osserva un intervallo di molti anni tra l'inizio della risposta autoimmune e le manifestazioni cliniche della malattia poiché prima di poterne osservare quest'ultime è necessario che più del 90% delle isole pancreatiche sia stato distrutto.

Patogenesi del diabete di tipo 1

Alla distruzione delle cellule β del pancreas possono contribuire numerosi meccanismi, tra i quali l'infiammazione attivata dai linfociti $CD4^+$ T_H1 diretti verso gli antigeni delle isole pancreatiche (inclusa l'insulina), la lisi delle cellule delle isole pancreatiche da parte di CTL, la produzione locale di citochine (come il TNF e l'IL-1) in grado di danneggiare le cellule delle isole pancreatiche e la produzione di autoanticorpi. Nei pochi casi in cui è stato possibile esaminare le lesioni delle isole pancreatiche agli stadi precoci, queste si sono presentate con un quadro infiammatorio definito insulite, caratterizzato da necrosi cellulare e infiltrazione di linfociti T, $CD4^+$ o $CD8^+$. In circolo, i pazienti mostrano la presenza di anticorpi specifici per le cellule delle isole pancreatiche e per l'insulina. Nei bambini che hanno una predisposizione familiare, ma che non hanno sviluppato la malattia, la presenza di autoanticorpi è considerata un fattore predittivo di malattia. Un modello animale estremamente informativo per il diabete di tipo 1 è costituito dai topi diabetici non obesi (*Non-Obese Diabetic*, NOD) che sviluppano spontaneamente la malattia. Questo modello ha permesso di evidenziare i deficit di sopravvivenza e funzionali dei linfociti T regolatori e la resistenza dei linfociti T effettori alla soppressione funzionale.

Molteplici geni sono associati al diabete di tipo 1 e una grande attenzione è stata focalizzata sul ruolo dei geni HLA. Infatti, il 90-95% dei pazienti caucasici affetti da diabete di tipo 1 esprime i geni HLA-DR3, DR4 o entrambi rispetto al 40% circa dei soggetti normali. Inoltre, il 40-50% dei pazienti è eterozigote (DR3/DR4), rispetto al 5% dei soggetti normali. Anche altri geni possono contribuire alla malattia. Il primo di questi a essere identificato è stato quello dell'insulina, in cui una serie di sequenze ripetute nella regione del promotore è associata alla suscettibilità alla malattia. I meccanismi alla base di questa associazione sono ancora sconosciuti, ma potrebbero condizionare l'espressione dell'insulina a livello timico con un effetto sulla selezione dei linfociti T durante la maturazione (selezione negativa). Molti altri polimorfismi sono stati identificati nei pazienti affetti da diabete di tipo 1 e nei topi NOD, inclusi quelli dei geni codificanti per IL-2 e CD25, le cui conseguenze funzionali non sono però ancora note. Alcuni studi hanno permesso di ipotizzare che le infezioni virali (per esempio quella da virus Coxsackie B4) potrebbero precedere l'esordio del diabete di tipo 1,

forse provocando un primo danno cellulare, cui seguirebbero una risposta infiammatoria, l'espressione delle molecole costimolatorie e la conseguente risposta autoimmune. I dati epidemiologici indicano tuttavia che le infezioni ripetute possono anche proteggere dall'insorgenza del diabete di tipo 1, analogamente a quanto avviene nel modello NOD. In effetti, è stato ipotizzato che una possibile ragione della crescente incidenza del diabete di tipo 1 nei Paesi sviluppati sia la diminuzione delle malattie infettive.

Nuove terapie per il diabete di tipo 1

Tra le nuove terapie per la cura del diabete di tipo 1 le più interessanti sono mirate a indurre la tolleranza attraverso peptidi "diabetogenici" derivati da antigeni isolati dalle isole pancreatiche (come per esempio la stessa insulina) o a generare o somministrare i linfociti T regolatori ai pazienti. Queste sperimentazioni cliniche sono comunque solo al loro inizio.

Malattie infiammatorie intestinali

Le malattie infiammatorie intestinali includono due condizoni, la malattia di Crohn e la colite ulcerosa, nelle quali l'infiammazione iniziata dai linfociti T è causa di danno intestinale. La malattia di Crohn è caratterizzata da infiammazione cronica e distruzione della parete intestinale, con frequente formazione di fistole. La colite ulcerosa si manifesta invece con lesioni per lo più confinate alla mucosa, caratterizzate da ulcere e focolai infiammatori. La patogenesi delle malattie infiammatorie intestinali è stata descritta nel Capitolo 14. Le nuove terapie per queste malattie comprendono l'impiego di anticorpi diretti contro il TNF o contro la catena p40 dell'IL-12 e l'IL-23.

RIEPILOGO

* I disordini causati da risposte immunitarie abnormi prendono il nome di malattie da ipersensibilità. Le risposte immunitarie patologiche possono essere di tipo autoimmune, cioè dirette contro autoantigeni, oppure risposte eccessive e non controllate verso antigeni estranei (per esempio di origine microbica).
* Le malattie da ipersensibilità possono essere causate da anticorpi che si legano ad autoantigeni cellulari o tissutali (ipersensibilità di tipo II), da immunocomplessi circolanti che si depositano nei tessuti (tipo III) o da linfociti T diretti contro autoantigeni tissutali (tipo IV). Le reazioni da ipersensibilità immediata (tipo I) sono la causa delle malattie allergiche, descritte nel Capitolo 20.

* I meccanismi effettori del danno tissutale causato da anticorpi sono l'attivazione del complemento e l'infiammazione mediata dalle cellule che esprimono i recettori per Fc. Alcuni anticorpi causano malattia interferendo con le normali funzioni cellulari, senza produrre danno tissutale.
* I meccanismi effettori del danno tissutale causato dai linfociti T sono le reazioni infiammatorie innescate dalle citochine prodotte principalmente dai linfociti $CD4^+$, T_H1 e T_H17, e la lisi cellulare da parte di CTL. La tipica reazione mediata dai linfociti T è l'ipersensibilità di tipo ritardato, causata dall'attivazione di linfociti T precedentemente sensibilizzati, che porta alla produzione di citochine in grado di reclutare e attivare i leucociti (principalmente macrofagi). L'autoimmunità deriva dalla rottura della tolleranza al self. In soggetti geneticamente predisposti, le reazioni autoimmuni vengono innescate da molteplici stimoli ambientali (come le infezioni).
* Attualmente, i principali approcci terapeutici alle malattie autoimmuni sono rivolti a ridurre al minimo l'attivazione delle risposte immunitarie e le conseguenze lesive delle reazioni autoimmuni. Gli approcci includono agenti in grado di bloccare l'infiammazione, come gli anticorpi contro le citochine e le integrine, e quelli che bloccano l'attivazione dei linfociti o che li eliminano. Futuri obiettivi terapeutici sono l'inibizione delle risposte dei linfociti autoreattivi e il ripristino della tolleranza al self.
* Lo studio delle malattie autoimmuni, come il lupus eritematoso sistemico, l'artrite reumatoide, la sclerosi multipla e il diabete di tipo 1, evidenzia molti dei meccanismi effettori che causano danno tissutale nelle reazioni di ipersensibilità e permette di illustrare il ruolo dei geni predisponenti e dei fattori ambientali coinvolti nello sviluppo dell'autoimmunità.

LETTURE CONSIGLIATE

Principi generali

Goodnow C.C: Multistep pathogenesis of autoimmune disease. *Cell* 130:25–35 (2007).

Nagata S.; Hanayama R.; Kawane K: Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* 140:619–630 (2010).

Malattie causate da anticorpi e da immunocomplessi

Banchereau J.; Pascual V: Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* 25:383–392 (2006).

Fairhurst A.M.; Wandstrat A.E.; Wakeland E.K: Systemic lupus erythematosus: multiple immunological phenotypes in a complex genetic disease. *Advances in Immunology* 92:1–69 (2006).

Jancar S.; Crespo M.S: Immune complex–mediated tissue injury: a multistep paradigm. *Trends in Immunology* 26:48–55 (2005).

Munoz L.E.; Lauber K.; Schiller M.; Manfredi A.A.; Herrmann M: The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nature Reviews Rheumatology* 6:280–289 (2010).

Plotz P.H: The autoantibody repertoire: searching for order. *Nature Reviews Immunology* 3:73–78 (2003).

Tsokos G.C: Systemic lupus erythematosus. *New England Journal of Medicine* 365:2110–2121 (2011).

Malattie causate dai linfociti T

Frohman E.M.; Racke M.K.; Raine C.S: Multiple sclerosis—the plague and its pathogenesis. *New England Journal of Medicine* 354:942–955 (2006).

Klareskog L.; Lundberg K.; Malmstrom V: Autoimmunity in rheumatoid arthritis: citrulline immunity and beyond. *Advances in Immunology* 118:129–158 (2013).

Maddur M.S.; Miossec P.; Kaveri S.V.; Bayry J: Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *American Journal of Pathology* 181:8–18 (2012).

McInnes I.B.; Schett G: The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine* 365:2205–2219 (2011).

Palmer M.T.; Weaver C.T: Autoimmunity: increasing suspects in the $CD4^+$ T cell lineage. *Nature Immunology* 11:36–40 (2010).

Terapie per malattie su base immunitaria

Burmester G.R.; Feist E.; Dorner T: Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 10:77–88 (2014).

Faurschou M.; Jayne D.R.W: Anti-B cell antibody therapies for inflammatory rheumatic diseases. *Annual Review of Medicine* 65:263–278 (2014).

Hauser S.L.; Chan J.R.; Oksenberg J.R: Multiple sclerosis: prospects and promise. *Annals of Neurology* 74:317–327 (2013).

Shwab I.; Nimmerjahn F: Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nature Reviews Immunology* 13:176–189 (2013).

Thanou A.; Merrill J.T: Treatment of systemic lupus erythematosus: new therapeutic avenues and blind alleys. *Nature Reviews Rheumatology* 10:23–34 (2014).

CAPITOLO 20

Allergie

CARATTERISTICHE GENERALI DELLE REAZIONI ALLERGICHE CAUSATE DALLE IgE

PRODUZIONE DI IgE

Natura degli allergeni

Attivazione dei linfociti T helper che producono IL-4

Attivazione dei linfociti B e scambio isotipico verso IgE

RUOLO DEI LINFOCITI T_H2, DEI MASTOCITI, DEI BASOFILI E DEGLI EOSINOFILI NELLE REAZIONI ALLERGICHE

Ruolo dei linfociti T_H2 e delle cellule linfoidi innate nelle allergie

Proprietà dei mastociti e dei basofili

Legame delle IgE ai mastociti e ai basofili: il recettore per Fcε

Attivazione dei mastociti

Mediatori prodotti dai mastociti

Proprietà degli eosinofili

REAZIONI ATTIVATE DALLE IgE E DAI MASTOCITI

Reazione immediata

Reazione di fase tardiva

BASI GENETICHE DELLA PREDISPOSIZIONE ALLE ALLERGIE

Allergie e fattori ambientali

MALATTIE A BASE ALLERGICA NELL'UOMO: PATOGENESI E TERAPIA

Anafilassi sistemica

Asma bronchiale

Reazioni di ipersensibilità immediata nel tratto respiratorio superiore, nel tratto gastrointestinale e nella cute

Immunoterapia delle malattie a base allergica

RUOLO PROTETTIVO DELLE RISPOSTE IMMUNITARIE ATTIVATE DALLE IgE E DAI MASTOCITI

RIEPILOGO

Svariate malattie sono causate da risposte immunitarie ad antigeni ambientali, di origine non microbica, che coinvolgono immunoglobuline E (IgE), linfociti T helper che producono IL-4, IL-5 e IL-13, mastociti e eosinofili. Nella fase effettrice di queste risposte, i mastociti e gli eosinofili vengono attivati e rilasciano rapidamente mediatori che causano vasodilatazione, aumento della permeabilità vascolare e contrazione della muscolatura liscia bronchiale e viscerale. Tali reazioni, nel loro insieme, vengono definite **ipersensibilità immediata**, poiché si manifestano rapidamente, entro pochi minuti dal legame dell'antigene ("immediata") e possono portare a importanti conseguenze patologiche ("ipersensibilità"). In associazione alla risposta immediata si attiva anche una risposta infiammatoria più lenta, definita **reazione di fase tardiva**, caratterizzata dall'accumulo di neutrofili, eosinofili e macrofagi. Va notato come il termine "ipersensibilità immediata" venga comunemente utilizzato per

descrivere l’insieme delle due risposte, immediata e tardiva, sopra descritte. In ambito clinico, le conseguenze delle reazioni di ipersensibilità sono comunemente definite allergia o atopia e le conseguenti malattie possono essere definite ancora con gli stessi termini di **allergia** e **atopia**, oppure come *malattie da ipersensibilità immediata*. Episodi ripetuti di ipersensibilità immediata possono portare allo sviluppo di malattie croniche a base allergica con rimodellamento e perfino danno tissutale. Gli antigeni che scatenano l’ipersensibilità immediata sono definiti **allergeni**. La maggior parte di essi sono comuni proteine ambientali di origine animale o sostanze chimiche che possono modificare le proteine self.

Il termine atopia originariamente aveva il significato di insolito, tuttavia oggi sappiamo che le allergie sono di gran lunga la più comune patologia a base immunitaria, che colpisce quasi il 20% della popolazione statunitense ed europea e la cui incidenza è in continuo aumento in tutto il mondo. Questo capitolo si occuperà di descrivere principalmente le reazioni immunitarie che sono la causa delle malattie a base allergica, la sequenza di eventi che porta all’attivazione dei mastociti e i ruoli dei vari mediatori dell’ipersensibilità immediata. Tratteremo poi le sindromi cliniche associate alle reazioni dovute alle IgE e ai mastociti, per parlare successivamente delle terapie usate per queste malattie. Il capitolo si concluderà con la trattazione del ruolo fisiologico delle reazioni immunitarie mediate dalle IgE nella difesa dell’organismo.

CARATTERISTICHE GENERALI DELLE REAZIONI ALLERGICHE CAUSATE DALLE IgE

Tutte le reazioni allergiche presentano caratteristiche comuni, sebbene differiscano notevolmente per quanto riguarda i tipi di antigeni che le scatenano e le manifestazioni clinicopatologiche che le caratterizzano.

- ***Il carattere distintivo delle malattie a base allergica è la produzione di IgE, che dipende dall’attivazione dei linfociti T helper che producono IL-4.*** Mentre gli individui sani non rispondono o rispondono in modo non lesivo agli antigeni ambientali più comuni, gli individui atopici sviluppano forti risposte, mediate da linfociti T

helper che producono IL-4, producendo quantità di IgE abnormi in risposta a queste sostanze.

- ***Nell'ipersensibilità immediata, la tipica sequenza di eventi che scaturisce dall'esposizione a un antigene consiste nell'attivazione di particolari popolazioni linfocitarie (linfociti T_H2 e linfociti T helper follicolari [T_{FH}] che producono IL-4 e linfociti B), a cui seguono dapprima la produzione di anticorpi di classe IgE che si legano ai recettori per Fc espressi dai mastociti e quindi la stimolazione dei mastociti dovuta alla loro riesposizione allo stesso antigene, con conseguente liberazione di mediatori e relativi effetti patologici*** (Fig. 20-1). Il legame delle IgE ai mastociti è anche denominato **sensibilizzazione**, poiché i mastociti rivestiti da IgE sono pronti a essere attivati al successivo incontro con l'antigene. Nei paragrafi seguenti descriveremo ognuno di questi passaggi.

- ***L'allergia è una tipica malattia mediata da linfociti T_H2. Molti degli eventi precoci e delle caratteristiche patologice della reazione allergica sono scatenati da particolari citochine prodotte dai linfociti T_H2 nei tessuti oppure dai linfociti T_{FH} negli organi linfoidi.*** I conseguenti processi sono quindi profondamente diversi da quelli che scatenano l'ipersensibilità ritardata, che è in effetti una reazione immunitaria mediata principalmente da linfociti T_H1 e dalle citochine da essi prodotte.

FIGURA 20-1 Sequenza degli eventi che caratterizzano le reazioni di ipersensibilità immediata. Le patologie da ipersensibilità immediata sono innescate dall'esposizione a un allergene che stimola l'attivazione dei linfociti T helper che producono IL-4 e quindi la produzione di IgE. Le IgE si legano all'FcεRI dei mastociti sensibilizzandoli. La riesposizione all'allergene attiva i mastociti a secernere i mediatori responsabili delle reazioni patologiche dell'ipersensibilità immediata.

- ***I segni clinicopatologici dell'allergia consistono nelle reazioni vascolari e della muscolatura liscia che si sviluppano rapidamente in***

seguito a ripetute esposizioni all'allergene (ipersensibilità immediata), nonché in una reazione tardiva di tipo infiammatorio. Benché queste reazioni siano innescate principalmente dall'attivazione dei mastociti da parte delle IgE, diversi altri mediatori vi partecipano svolgendo importanti ruoli. I mastociti sono presenti in tutte le componenti connettivali e subepiteliali e quindi saranno i siti più frequentemente interessati dalle reazioni di ipersensibilità immediata. Alcune reazioni allergiche possono essere innescate da stimoli non immunologici, come l'esercizio fisico o l'esposizione al freddo. Tali stimoli inducono la degranulazione e il rilascio di mediatori in assenza di esposizione all'antigene o di produzione di IgE. Le reazioni allergiche di questo tipo sono definite *non atopiche*.

- ***Le reazioni allergiche si manifestano con diverse modalità, in relazione al tessuto interessato***. ***Le principali manifestazioni cliniche consistono in rash cutanei, congestione dei sinusoidi, broncocostrizione, dolori addominali, diarrea e shock sistemico.*** Nella forma sistemica più grave, detta **anafilassi**, i mediatori rilasciati dai mastociti possono provocare il restringimento delle vie aeree fino a produrre asfissia e causare un collasso cardiovascolare che può portare a morte. In effetti, il termine "anafilassi" fu coniato per indicare come gli anticorpi, specialmente quelli di classe IgE, possano provocare fenomeni opposti alla protezione (profilassi). Si tornerà sulla patogenesi di queste reazioni più avanti in questo capitolo.

- ***Lo sviluppo delle allergie è in definitiva il risultato di una serie di interazioni genetico-ambientali estremamente complesse e ad oggi ancora scarsamente conosciute.*** È noto che esiste una chiara predisposizione genetica allo sviluppo di allergie. In effetti, rispetto ad estranei, i parenti di individui allergici svilupperanno più facilmente allergie, anche vivendo in ambienti diversi. Sono stati sinora identificati molti geni responsabili della predisposizione alle allergie, che verranno descritti più avanti in questo stesso capitolo. D'altra parte, anche svariati fattori ambientali, presenti specialmente nelle società industrializzate, hanno una profonda influenza sulla predisposizione alle allergie, incluse la presenza di allergeni e l'esposizione a microrganismi.

Dopo questa introduzione, possiamo procedere alla descrizione delle distinte fasi che contraddistinguono le reazioni di ipersensibilità immediata.

PRODUZIONE DI IgE

Gli individui atopici producono elevati livelli di IgE in risposta ad allergeni ambientali, mentre i soggetti normali producono generalmente altri isotipi (IgM e IgG) e solo piccole quantità di IgE. La quantità di IgE sintetizzate da un individuo dipende dalla sua propensione a generare linfociti T helper specifici per l'allergene che producono IL-4 e IL-13, perché queste citochine stimolano nei linfociti B lo scambio di classe verso le IgE. La sviluppo di risposte verso specifici antigeni da parte di linfociti T che producono IL-4 e IL-13 può essere influenzato da svariati fattori, tra cui la predisposizione genetica, la natura degli antigeni ed eventuali precedenti esposizioni all'antigene.

Le IgE sono responsabili della sensibilizzazione dei mastociti e rappresentano il meccanismo di riconoscimento dell'antigene che scatena l'ipersensibilità immediata. Le IgE sono l'isotipo anticorpale che contiene la catena pesante ε (vedi Cap. 5). Tale catena si lega a specifici recettori per Fc espressi dai mastociti, determinandone l'attivazione.

Natura degli allergeni

Gli antigeni che provocano le reazioni di ipersensibilità immediata (allergeni) sono proteine (o sostanze chimiche legate a proteine). Sono tipiche sostanze allergenizzanti le proteine dei pollini, gli acari della polvere, il pelo degli animali, alcuni cibi e farmaci (come la penicillina). Non è noto perché solo alcuni tipi di antigeni agiscano da allergeni inducendo una risposta dei linfociti T helper che li porta a produrre principalmente IL-4, causando così le conseguenti reazioni allergiche. Gli allergeni condividono due caratteristiche: quella di venire ripetutamente a contatto con l'individuo e quella di non essere generalmente in grado, a differenza dei microrganismi, di stimolare l'immunità innata, con la conseguente produzione da parte dei macrofagi e delle cellule dendritiche di citochine polarizzanti i linfociti T_H1 e T_H17. L'attivazione cellulare

cronica o ripetuta in assenza di forti risposte immunitarie innate può orientare la differenziazione dei linfociti T $CD4^+$ preferenzialmente verso T_H2 (vedi Cap. 10).

L'allergenicità di un antigene può anche dipendere dalla sua natura chimica. Alcuni elementi sono comuni a molti allergeni, sebbene non siano state identificate nelle proteine caratteristiche strutturali che consentano di predire con certezza la loro capacità allergenica. Tra gli elementi comuni vi sono il modesto peso molecolare (compreso tra 5 e 70 kD), il grado di glicosilazione e la spiccata solubilità nei fluidi corporei. In effetti, le reazioni anafilattiche agli alimenti avvengono tipicamente in risposta a proteine glicosilate di piccole dimensioni. Probabilmente, queste caratteristiche strutturali proteggono gli antigeni dalla denaturazione e/o degradazione nel tratto gastrointestinale e permettono il loro assorbimento nella forma nativa. È interessante notare come molti allergeni, come la proteasi cisteinica dell'acaro della polvere domestica *Dermatophagoides pteronyssinus* e la fosfolipasi A_2 del veleno dell'ape, siano enzimi. Non è noto tuttavia se questa attività enzimatica svolga un ruolo nell'innesco delle reazioni di ipersensibilità immediata.

Le reazioni di ipersensibilità immediata dipendono dai linfociti T $CD4^+$, per questo motivo gli antigeni T-indipendenti, come i polisaccaridi, non possono provocare tali reazioni, a meno che non siano coniugati a proteine. Alcune sostanze non proteiche, come la penicillina, possono provocare potenti reazioni IgE-mediate, poiché reagiscono chimicamente con i residui aminoacidici delle proteine self per formare coniugati aptene-carrier in grado di attivare efficacemente i linfociti T helper che producono IL-4 e la conseguente produzione di IgE.

La storia naturale dell'esposizione a un antigene costituisce un importante fattore che influenza la produzione di anticorpi IgE specifici. L'esposizione ripetuta a uno specifico antigene è necessaria per lo sviluppo di una reazione allergica, poiché prima che si scateni una reazione di ipersensibilità immediata devono avvenire sia lo scambio di classe sia la sensibilizzazione dei mastociti da parte delle IgE. I soggetti con rinite allergica o asma bronchiale spesso traggono beneficio da uno spostamento geografico della residenza, poiché ciò comporta un cambiamento nei tipi di

polline ai quali si è esposti, sebbene nuovi antigeni possano riproporre la stessa sintomatologia. L'esempio più eclatante dell'importanza dell'esposizione ripetuta agli antigeni è fornito dai casi di puntura d'insetto. Le tossine proteiche contenute nel veleno non sono solitamente pericolose in occasione del primo contatto, dato che il soggetto atopico non ha ancora prodotto IgE specifiche. Ciononostante, questa prima esposizione potrebbe essere sufficiente a indurre la produzione di IgE specifiche in grado di scatenare, a una seconda puntura da parte di un insetto, una reazione anafilattica fatale. In modo analogo piccole esposizioni alle arachidi possono scatenare reazioni fatali negli individui precedentemente sensibilizzati.

Attivazione dei linfociti T helper che producono IL-4

Nelle malattie a base allergica, la presenza di linfociti T_{FH} è necessaria per indurre la differenziazione dei linfociti B che producono IgE mentre i linfociti T_H2 svolgono un ruolo centrale nello sviluppo delle reazioni infiammatorie a livello tissutale. È probabile che le cellule dendritiche degli epiteli, attraverso i quali gli allergeni penetrano nell'organismo, catturino gli antigeni, li trasportino ai linfonodi drenanti e li processino per presentarli, sotto forma di peptidi, ai linfociti T naïve che si possono quindi differenziare in linfociti T_H2 o in linfociti T helper follicolari (T_{FH}), che secernono citochine T_H2. I principali responsabili dello sviluppo dei linfociti della sottopopolazione T_H2 sono le citochine (specialmente l'IL-4), che possono essere prodotte da diversi tipi cellulari (vedi Cap. 10). Inoltre, la linfopoietina stromale timica, una citochina secreta dalle cellule epiteliali cutanee, intestinali e polmonari, stimola nelle cellule dendritiche tissutali e nelle cellule linfoidi innate la capacità di promuovere la differenziazione dei linfociti T_H2. I processi che inducono la differenziazione dei linfociti T_{FH} che producono IL-4 sono invece meno noti ma sono probabilmente simili a quelli coinvolti nella differenziazione dei linfociti T_H2.

I linfociti T_H2 differenziati migrano nei tessuti ove è presente l'allergene, contribuendo alla fase effettrice infiammatoria delle reazioni allergiche

(vedi più avanti). I linfociti T_{FH} restano invece negli organi linfoidi, dove svolgono il loro ruolo adiuvante i linfociti B.

Attivazione dei linfociti B e scambio isotipico verso IgE

Come in altre risposte linfocitarie B, dipendenti dai linfociti T (vedi Cap. 12), anche i linfociti B specifici per gli allergeni vengono attivati dai linfociti T_{FH} negli organi linfoidi. In risposta al ligando di CD40 e alle citochine prodotte dai linfociti T_{FH} (principalmente IL-4 e forse anche IL-13), i linfociti B vanno incontro a scambio isotipico della catena pesante iniziando a produrre IgE. Normalmente, le IgE sono presenti nel plasma come anticorpi bivalenti a una concentrazione mai superiore a 1 μg/ml. In condizioni patologiche come le infezioni elmintiche e l'atopia grave, questo valore può invece salire a più di 1.000 μg/ml. Le IgE specifiche per l'allergene prodotte dai plasmablasti e dalle plasmacellule entrano in circolo e si legano ai recettori per Fc presenti sui mastociti tissutali. In questo modo tali cellule si sensibilizzano, diventando pronte a reagire a un successivo incontro con lo stesso allergene. Anche i basofili circolanti sono in grado di legare le IgE.

RUOLO DEI LINFOCITI T_H2, DEI MASTOCITI, DEI BASOFILI E DEGLI EOSINOFILI NELLE REAZIONI ALLERGICHE

I linfociti T_H2, i mastociti, i basofili e gli eosinofili sono le principali cellule effettrici delle reazioni di ipersensibilità immediata e delle malattie a base allergica. Anche se ciascuno di questi tipi cellulari ha caratteristiche peculiari, tutti condividono la capacità di secernere i mediatori delle reazioni allergiche. Diversamente dai linfociti T_H2, i mastociti, i basofili e gli eosinofili possiedono granuli citoplasmatici che contengono amine ed enzimi preformati e producono mediatori lipidici e citochine che inducono l'infiammazione (Tab. 20-1). I linfociti T_H2 invece contribuiscono all'infiammazione principalmente secernendo citochine. In questo paragrafo discuteremo i ruoli di questi tipi cellulari nelle reazioni allergiche.

TABELLA 20-1 Caratteristiche dei mastociti, dei basofili e degli eosinofili

Caratteristica	Mastociti	Basofili	Eosinofili
Principale sito di maturazione	Tessuto connettivo	Midollo osseo	Midollo osseo
Cellule circolanti	No	Sì (0,5% dei leucociti del sangue)	Sì (~2% dei leucociti del sangue)
Cellule mature reclutate dal sangue nei tessuti	No	Sì	Sì
Cellule mature residenti nei tessuti connettivi	Sì	No	Sì
Capacità proliferativa delle cellule mature	Sì	No	No
Emivita	Da settimane a mesi	Giorni	Da giorni a settimane
Fattore principale nello sviluppo (citochina)	Fattore della cellula staminale, IL-3	IL-3	IL-5
Espressione di FcεRI	Livelli elevati	Livelli elevati	Bassi livelli (funzione non chiara)
Contenuto principale dei granuli	Istamina, eparina e/o condroitin solfato, proteasi	Istamina, condroitin solfato, proteasi	Proteina basica maggiore, proteina cationica degli eosinofili, perossidasi, idrolasi, lisofosfolipasi

FcεRI, recettore per Fcε di tipo I; IL, interleuchina.

Ruolo dei linfociti T_H2 e delle cellule linfoidi innate nelle allergie

I linfociti T_H2 secernono citochine, tra le quali IL-4, IL-5 e IL-13, che agiscono in associazione ai mastociti e agli eosinofili promuovendo le risposte infiammatorie agli allergeni presenti nei tessuti. Le proprietà generali dei linfociti T_H2 e i segnali che guidano la loro differenziazione da linfociti T naïve sono stati discussi nel Capitolo 10. L'IL-4 secreta dai linfociti T_H2 induce l'espressione di VCAM-1 sull'endotelio che, a sua volta, promuove il reclutamento degli eosinofili e di altri linfociti T_H2 nei tessuti. L'IL-5 secreta dai linfociti T_H2 induce invece l'attivazione degli eosinofili reclutati. L'IL-13 stimola le cellule epiteliali (per esempio quelle delle vie aeree) a secernere maggiori quantità di muco e in effetti un'eccessiva produzione di muco è una caratteristica comune a queste reazioni. Infine, i linfociti T_H2 contribuiscono all'instaurarsi della risposta infiammatoria di fase tardiva che verrà descritta più avanti.

In accordo con il ruolo centrale svolto dai linfociti T_H2 nell'ipersensibilità immediata, gli individui atopici presentano in circolo un numero più elevato di linfociti T secernenti IL-4 rispetto ai soggetti non atopici. Sempre nei pazienti atopici, i linfociti T producono una maggiore quantità di IL-4 rispetto ai linfociti T di individui normali. In modelli animali, una patologia simile all'asma può essere riprodotta inducendo l'espansione di linfociti T_H2 specifici per un antigene inalato o attraverso il trasferimento adottivo di queste cellule in topi vergini. In questi animali, un accumulo di linfociti T_H2 è in effetti riscontrabile nei siti delle reazioni di ipersensibilità immediata a livello sia della cute che della mucosa bronchiale.

Le cellule linfoidi innate del gruppo 2 secernono anch'esse IL-5 e IL-13 (vedi Cap. 4) ed esperimenti con modelli animali hanno dimostrato che le citochine derivate da queste cellule contribuiscono alle reazioni infiammatorie allergiche delle vie aeree.

Proprietà dei mastociti e dei basofili

Tutti i mastociti derivano da progenitori midollari. In condizioni normali, non sono riscontrabili mastociti maturi circolanti. I progenitori di queste cellule migrano nei tessuti periferici come forme immature e vanno

incontro a differenziazione in risposta a diversi segnali biochimici presenti nel microambiente locale, tra i quali il fattore delle cellule staminali rilasciato dalle cellule tissutali, che si lega al recettore c-Kit espresso dal progenitore del mastocita. I mastociti maturi sono presenti in tutti i distretti dell'organismo, soprattutto in vicinanza dei vasi sanguigni (Fig. 20-2, *A*) e dei nervi, nei distretti subepiteliali e negli organi linfoidi. I mastociti umani sono caratterizzati da una morfologia estremamente variabile, pur presentando nuclei generalmente rotondeggianti e un citoplasma ricco di granuli con corpi lipidici associati alle membrane. Tali granuli contengono proteoglicani acidi che legano i coloranti basici.

FIGURA 20-2 Morfologia dei mastociti, dei basofili e degli eosinofili. Microfotografie con colorazione Wright-Giemsa di mastociti perivascolari dermici (*frecce*) (**A**); di basofili del sangue periferico (**B**); di un eosinofilo (**C**). Si noti la caratteristica colorazione blu dei granuli citoplasmatici dei basofili e la colorazione rossa dei granuli citoplasmatici degli eosinofili. (***A,*** *Per gentile concessione del Dr. George Murphy.* ***B*** *e* ***C,*** *Per gentile concessione del Dr. Jonathan Hecht, Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts*.)

I mastociti attivati secernono un'ampia varietà di mediatori chimici responsabili delle manifestazioni allergiche (Tab. 20-2). Tra questi vi sono sostanze immagazzinate nei granuli, che possono essere rapidamente liberate, e altre che devono invece essere sintetizzate *ex novo* in seguito all'attivazione cellulare. La produzione e i meccanismi d'azione di queste sostanze verranno descritti in seguito.

TABELLA 20-2 Mediatori prodotti dai mastociti, dai basofili e dagli eosinofili

Tipo cellulare	Categoria del mediatore	Mediatore	Funzione/Effetti patologici
Mastociti e basofili			
	Preformati e conservati in	Istamina Enzimi: proteasi neutre (triptasi e/o	Aumenta la permeabilità vascolare; stimola la contrazione delle cellule

	granuli citoplasmatici	chimasi), idrolasi acide, capatepsine G, carbossipeptidasi	muscolari lisce Degradano le strutture microbiche; danno/rimodellamento tissutale
	Mediatori lipidici prodotti nel corso dell'attivazione	Prostaglandina D_2	Vasodilatazione, broncocostrizione, chemotassi leucocitaria
		Leucotriene C_4, D_4, E_4	Broncocostrizione prolungata, secrezione di muco, aumentata permeabilità vascolare
		Fattore attivante le piastrine	Vasodilatazione, aumento della permeabilità vascolare, adesione, chemotassi, degranulazione e burst ossidativo dei leucociti
	Citochine prodotte nel corso dell'attivazione	IL-3	Proliferazione dei mastociti
		TNF, MIP-1α	Infiammazione/Reazione di fase tardiva
		IL-4, IL-13	Produzione di IgE, secrezione di muco
		IL-5	Produzione e attivazione degli eosinofili
Eosinofili			
	Preformati e conservati in granuli citoplasmatici	Proteina basica maggiore, Proteina cationica degli eosinofili	Tossiche per elminti, batteri, cellule ospite Degradazione della parete degli elminti e dei protozoi;
		Perossidasi eosinofila, idrolasi	danno/rimodellamento tissutale

	lisosomiali, lisofosfolipasi	
Mediatori lipidici prodotti nel corso dell'attivazione	Leucotriene C_4, D_4, E_4	Broncocostrizione prolungata, secrezione mucosa, aumentata permeabilità vascolare
Citochine prodotte nel corso dell'attivazione	IL-3, IL-5, GM-CSF	Produzione e attivazione degli eosinofili
	IL-8, IL-10, RANTES, MIP-1α, eotassina	Chemotassi dei leucociti

GM-CSF, *Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor*; IL, interleuchina; MIP-1α, *Monocyte Inflammatory Protein-1*α; RANTES, *Regulated by Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*; TNF, *Tumor Necrosis Factor*.

Sono state descritte due principali sottopopolazioni, una presente nella mucosa gastrointestinale e l'altra nei tessuti connettivi. I mastociti mucosali sono ampiamente distribuiti nella mucosa intestinale e negli spazi alveolari del polmone e contengono nei loro granuli abbondanti quantità di condroitinsolfato e di triptasi ma scarsi livelli di istamina. I mastociti connettivali, presenti soprattutto nella pelle e nella sottomucosa intestinale, contengono nei loro granuli abbondanti quantità di eparina e di proteasi neutre e producono grandi quantità di istamina. la presenza dei linfociti T è necessaria solo per lo sviluppo dei mastociti mucosali ma non per quello dei mastociti connettivali. La localizzazione, il contenuto dei granuli e la dipendenza dai linfociti T delle due diverse sottopopolazioni mastocitarie suggeriscono che ognuna di esse possa svolgere un importante ruolo nell'ambito dei diversi processi patologici. È infatti probabile che i mastociti mucosali siano principalmente coinvolti nelle reazioni di ipersensibilità immediata T- e IgE-dipendenti che avvengono a livello dell'apparato respiratorio (per esempio l'asma bronchiale), così come di altre mucose. Al contrario, i mastociti connettivali sono coinvolti nelle reazioni di ipersensibilità immediata a livello cutaneo. Anche se la distinzione dei mastociti in queste due sottopopolazioni ha facilitato il loro studio, *in vivo* esse non sono sempre ben distinguibili.

I basofili sono granulociti presenti in circolo, caratterizzati da analogie strutturali e funzionali con i mastociti. Come gli altri granulociti, i basofili derivano da progenitori midollari (una linea maturativa differente da quella dei mastociti), maturano nel midollo osseo e circolano nel sangue (vedi Fig. 20-2, *B*). I basofili costituiscono meno dell'1% dei leucociti ematici, possono essere richiamati in alcune sedi infiammatorie, sebbene non siano normalmente presenti nei tessuti, e contengono granuli che legano i coloranti basici e sono capaci di sintetizzare molti dei mediatori prodotti dai mastociti (vedi Tab. 20-2). Come i mastociti, i basofili esprimono FcεRI, legano le IgE e vengono attivati in seguito al legame dell'antigene con questi anticorpi. Quindi, una volta richiamati nel distretto tissutale dove è presente l'antigene, possono contribuire alle reazioni di ipersensibilità immediata.

Legame delle IgE ai mastociti e ai basofili: il recettore per Fcε

I mastociti e i basofili esprimono un recettore per Fc ad alta affinità specifico per le catene pesanti ε, perciò in grado di legare le IgE, definito FcεRI. Le IgE, come tutti gli altri anticorpi, sono prodotte esclusivamente dai linfociti B e una volta che si sono legate a FcεRI agiscono come recettori per l'antigene sulla superficie dei mastociti e dei basofili. L'affinità di FcεRI è molto alta (costante di dissociazione [K_d] pari a circa 1×10^{-10} M); questo legame è molto più forte rispetto a quello di qualsiasi altro recettore per Fc per il proprio ligando. Quindi, la normale concentrazione sierica di IgE, benché bassa se confrontata con altri isotipi (generalmente minore di 5×10^{-10} M), è sufficiente per saturare i recettori per FcεRI. Oltre che sui mastociti, sui basofili e sugli eosinofili, FcεRI è stato identificato anche sulle cellule di Langerhans della cute, su alcuni macrofagi dermici e sui monociti attivati. La funzione del recettore in molte di queste cellule non è però ancora nota.

Ciascuna molecola di FcεRI è composta da una catena α, responsabile del legame con l'anticorpo, da una catena β e da due catene γ responsabili della trasduzione del segnale (Fig. 20-3). La porzione aminoterminale extracellulare della catena γ comprende due domini Ig che formano il sito di legame per le IgE. La catena β, che attraversa la

membrana quattro volte, contiene un singolo motivo ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motif*) nella sua porzione carbossiterminale citoplasmatica. Le due catene γ sono identiche e legate da un ponte disolfuro e sono omologhe alla catena ζ del complesso recettoriale del linfocita T (vedi Cap. 7). La porzione citoplasmatica di ciascuna catena γ presenta un dominio ITAM. Le catene γ fungono da subunità di trasduzione del segnale, oltre che per FcεRI, anche per FcγRI, FcγRIIIA e FcαR e sono quindi definite catene γ degli FcR (vedi Cap. 13). La fosforilazione in tirosina dei domini ITAM delle catene β e γ attiva la trasduzione del segnale che è necessaria per l'attivazione dei mastociti, descritta più avanti. Gli FcεRI espressi dagli eosinofili e da molti altri tipi cellulari sono privi della catena β, cosicché in queste cellule la trasduzione del segnale risulta mediata dalla sola catena γ.

FIGURA 20-3 Struttura del recettore per Fc ad alta affinità delle IgE (FcεRI). Le IgE (*non rappresentate in scala*) si legano alle regioni Ig della catena α. La catena β e le catene γ mediano la trasduzione del segnale. Nei manicotti nella regione citoplasmatica delle catene β e γ sono presenti le sequenze ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motifs*), simili a quelle presenti nel complesso del recettore delle cellule T (*T Cells Receptor*, TCR) (vedi Fig. 7-5). Lyn e Syk sono due tirosine chinasi che legano le catene β e γ, partecipando al processo di trasduzione del segnale. La rappresentazione schematica di FcεRI è mostrata nel Capitolo 12.

L'importanza di FcεRI nelle reazioni di ipersensibilità da IgE è stata dimostrata in topi knockout per la catena α. In questi animali, la somministrazione per via endovenosa delle IgE e dell'antigene per cui sono specifiche non induce nessuna reazione anafilattica, a differenza di quanto avviene nei topi wild-type. Le stesse IgE inducono l'espressione di FcεRI su mastociti e basofili creando un meccanismo di amplificazione delle reazioni IgE-mediate.

Un altro recettore per le IgE, definito FcεRII o CD23, è una proteina strutturalmente correlata alle lectine di tipo C e possiede un'affinità per le IgE molto inferiore di quella di FcεRI. Il ruolo biologico di FcεRII non è ancora stato chiarito.

Attivazione dei mastociti

I mastociti vengono attivati dall'aggregazione dei FcεRI che si verifica solo in seguito al legame degli antigeni multivalenti alle molecole di IgE legate al recettore (Fig. 20-4). In un individuo allergico a un particolare antigene, un'elevata percentuale delle IgE legate a FcεRI dei mastociti è specifica per quell'antigene, la cui presenza permetterà l'aggregazione di una quantità di IgE sufficiente a innescare l'attivazione dei mastociti. Per contro, nei soggetti non atopici, le IgE associate ai mastociti sono specifiche per gli antigeni che in precedenti esposizioni avevano indotto la sintesi di bassi livelli di IgE. Quindi, nessun singolo antigene sarà di per sé in grado di indurre l'aggregazione di un numero di IgE sufficiente a provocare l'attivazione dei mastociti.

FIGURA 20-4 Attivazione dei mastociti. A-B. Legandosi alle IgE, l'antigene induce l'aggregazione di FcεRI provocando il rilascio dei mediatori che causano la reazione di ipersensibilità. Altri stimoli (incluso il frammento C5a del complemento) possono stimolare i mastociti. **C.** Microfotografia ottenuta al microscopio ottico di un mastocita in condizioni di riposo con abbondanti granuli di colore viola. Tali granuli sono anche visibili nella microfotografia ottenuta al microscopio elettronico mostrata in **E.** Viceversa, un mastocita attivato, ormai privo di granuli, è mostrato nella microfotografia ottenuta al microscopio ottico (**D**) ed elettronico (**F**). (*Per gentile concessione del Dr. Daniel Friend, Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts.*)

L'attivazione dei mastociti innesca tre tipi di risposte: la secrezione del contenuto dei loro granuli mediante esocitosi (degranulazione), la sintesi e la secrezione di mediatori lipidici e la sintesi e la secrezione di citochine. La cascata di trasduzione del segnale generata dall'aggregazione degli FCεRI è simile a quella innescata dal riconoscimento degli antigeni da parte dei linfociti (Fig. 20-5; vedi anche Cap. 7). La tirosina chinasi Lyn è costitutivamente associata alla coda citoplasmatica della catena β di FcεRI. Quando l'antigene causa l'aggregazione di FcεRI, essa fosforila i

domini ITAM presenti nelle porzioni citoplasmatiche delle catene β e γ. La tirosina chinasi Syk è successivamente reclutata a livello degli ITAM della catena γ, dove viene attivata inducendo a sua volta la fosforilazione e l'attivazione di altre proteine della cascata della trasduzione, tra le quali varie molecole adattatrici ed enzimi che partecipano alla formazione di un complesso di trasduzione simile a quello dei linfociti T. La proteina LAT (*Linker for Activation of T cells*) è una delle molecole adattatrici per l'attivazione dei mastociti a cui si lega fosfolipasi Cγ (PLCγ). Una volta legata alla proteina LAT, PLCγ si fosforila e catalizza la degradazione del fosfatidilinositolo bisfosfato che porta alla formazione di inositolo trifosfato (IP3) e diacilglicerolo (DAG) (vedi Cap. 7). A sua volta, IP3 induce un aumento del calcio citoplasmatico, mentre il DAG attiva la proteina chinasi C (PKC). Un'altra via di attivazione della PKC coinvolge la tirosina chinasi Fyn, che induce la fosforilazione della proteina adattatrice Gab2 (*Grb-2 associated binder-like protein 2*), che a sua volta lega e attiva la chinasi fosfatidilinositolo-3 (*Phosphoinositide 3-Kinase*, PI-3K), anch'essa in grado di attivare la PKC.

FIGURA 20-5 Eventi biochimici nell'attivazione dei mastociti. L'aggregazione delle IgE indotta dall'antigene attiva le tirosine chinasi Syk e Lyn, che a loro volta inducono l'attivazione della cascata mediata dalle MAPK e della fosfolipasi C_γ (PLC_γ). Quest'ultima catalizza la produzione di inositolo trifosfato (IP3) e diacilglicerolo (DAG) a partire da PIP_2 presente nelle membrana. L'IP_3 causa il rilascio di calcio intracellulare dal reticolo endoplasmatico. Il calcio e il DAG attivano la PKC che fosforila substrati, come le proteine delle catene leggere della miosina, provocando la degradazione e quindi il rilascio dei mediatori preformati. Il calcio e le MAPK stimolano invece PLA_2, che innesca la sintesi dei mediatori lipidici, come la prostaglandina D_2 (PGD_2) e il leucotriene C_4 (LTC_4).

Questi segnali scatenano tre principali risposte:

- ***Degranulazione.*** La PKC attivata induce la fosforilazione della catena leggera della miosina causando il disassemblamento dei complessi actina-miosina presenti sotto la membrana plasmatica, processo che

permette ai granuli citoplasmatici di entrare in contatto con la membrana plasmatica. Nei mastociti, la fusione della membrana dei granuli con quella plasmatica è mediata da alcuni membri della famiglia delle proteine SNARE, peraltro coinvolte anche in numerosi altri processi di fusione delle membrane cellulari. Le proteine SNARE, differenzialmente espresse sulle due membrane, interagiscono tra loro formando un complesso multimerico responsabile della fusione delle membrane stesse. La formazione dei complessi tra le proteine SNARE è regolata da diverse proteine accessorie, tra le quali la guanosina trifosfatasi Rab3 e diverse altre fosfatasi e chinasi associate alla Rab. Nei mastociti quiescenti queste proteine regolatorie inibiscono la formazione dei complessi SNARE e quindi la fusione dei granuli con la membrana plasmatica. L'aumento dei livelli di calcio citoplasmatico e l'attivazione della PKC che si verificano in conseguenza all'aggregazione di FcεRI bloccano l'attività inibitoria delle proteine accessorie. Inoltre, particolari proteine che agiscono da "sensori" del calcio rispondono all'aumento del calcio citoplasmatico, promuovendo la formazione dei complessi delle proteine SNARE e la fusione delle membrane. A seguito della fusione delle membrane, il contenuto dei granuli viene rilasciato nell'ambiente extracellulare. Tale processo avviene nei pochi secondi successivi all'aggregazione di FCεRI e può essere visualizzato a livello morfologico osservando la perdita dei granuli densi dei mastociti (vedi Fig. 20-4). Le funzioni biologiche dei mediatori rilasciati dal processo di degranulazione verranno descritte più avanti.

- ***Produzione dei mediatori lipidici.*** La sintesi dei mediatori lipidici è controllata dall'attivazione della fosfolipasi A_2 citoplasmatica (*PhosphoLipase* A_2, PLA_2) (Fig. 20-5). Questo enzima è attivato da due distinti segnali: la sua fosforilazione è catalizzata dalle chinasi MAPK (*Mitogen Activate Protein Kinases*), come ERK (*Extracellular Receptor-activated Kinase*), e dall'aumento della concentrazione citoplasmatica di calcio. ERK si attiva in seguito a una cascata di chinasi innescata dalle sequenze ITAM, probabilmente simile a quella che avviene nei linfociti T (vedi Cap. 9). Una volta attivata, la PLA_2 catalizza l'idrolisi dei fosfolipidi di membrana rilasciando substrati che sono poi convertiti attraverso differenti cascate enzimatiche. Il

substrato più importante è l'acido arachidonico, convertito dalla ciclossigenasi o dalla lipossigenasi in diversi mediatori (vedi più avanti).

- ***Produzione di citochine.*** La secrezione di citochine da parte dei mastociti attivati è conseguente all'induzione della trascrizione genica. Gli eventi biochimici che regolano tale processo sono simili a quelli che si verificano nei linfociti T. Il reclutamento e l'attivazione delle molecole adattatrici e delle tirosine chinasi che si verifica in risposta all'aggregazione di FcεRI portano alla traslocazione nucleare del fattore nucleare delle cellule T attivate (*Nuclear Factor of Activated T cells*, NFAT) e del fattore nucleare κB (*Nuclear Factor κB*, NF-κB), nonché all'attivazione della proteina AP-1 (*Activation Protein-1*) da parte di proteine chinasi come JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*). Questi fattori stimolano l'espressione di diverse citochine (tra le quali IL-4, IL-5, IL-6 e il fattore di necrosi tumorale [*Tumor Necrosis Factor*, TNF]), ma non dell'IL-2, contrariamente a quanto avviene nei linfociti T.

L'attivazione dei mastociti attraverso FcεRI è regolata da diversi recettori inibitori che contengono nella loro coda intracitoplasmatica la sequenza ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*) (vedi Cap. 7). Uno di questi recettori è FcγRIIB, che può aggregarsi a FcεRI durante l'attivazione dei mastociti, determinando la fosforilazione della sua sequenza ITIM da parte della chinasi Lyn. Ciò porta al reclutamento della fosfatasi SH2 contenente l'inositol 5-fosfatasi (*SH2 domain-containing Inositol Phosphatase*, SHIP) e all'inibizione del segnale mediato da FcεRI. Gli esperimenti effettuati sui topi indicano che FcγRIIB può regolare la degranulazione dei mastociti *in vivo*. I mastociti esprimono anche altri recettori inibitori, ma la loro importanza *in vivo* non è ancora chiara.

Oltre che dall'aggregazione di FcεRI mediata dagli allergeni, i mastociti possono anche essere attivati da una varietà di sostanze biologiche, tra le quali composti polibasici, peptidi, chemochine e anafilotossine derivate dalla cascata del complemento (C3a, C4a, C5a). Questo tipo alternativo di attivazione potrebbe amplificare le reazioni mediate dalle IgE oppure mediare le reazioni di ipersensibilità immediata di tipo non immune.

Distinte sottopopolazioni di mastociti o di basofili possono rispondere alle chemochine prodotte dai fagociti mononucleati, tra le quali CCL3 (nell'ambito dell'immunità innata), o a chemochine prodotte dai linfociti T (nell'ambito dell'immunità specifica cellulo-mediata). Le anafilotossine derivate dal complemento (in particolare il frammento C5a) si legano a recettori specifici presenti sui mastociti, stimolando la degranulazione. Tutte queste citochine e i frammenti del complemento sono verosimilmente prodotti a livello del focolaio infiammatorio, suggerendo che l'attivazione dei mastociti e il conseguente rilascio di mediatori potrebbero amplificare anche le reazioni immunitarie indipendenti dalle IgE. Composti polibasici come il 48/40 e il mastoparan vengono usati come stimoli farmacologici dei mastociti. Queste molecole contengono una regione cationica adiacente a una regione idrofobica e agiscono attivando le proteine G.

Numerosi neuropeptidi, inclusi la sostanza P, la somatostatina e il peptide intestinale vasoattivo, inducono il rilascio di istamina da parte dei mastociti e possono mediare in queste stesse cellule un'attivazione di tipo neuroendocrino. È in effetti noto come il sistema nervoso sia in grado di influenzare le reazioni di ipersensibilità. In quest'ambito, i neuropeptidi potrebbero svolgere proprio questa funzione. L'arrossamento che si produce ai margini del pomfo nelle reazioni di ipersensibilità immediata è in parte causato dal sistema nervoso, come dimostrato dall'osservazione che esso è marcatamente ridotto nelle regioni cutanee dove l'innervazione è assente. Anche le basse temperature e l'intenso esercizio fisico possono innescare la degranulazione dei mastociti, ma i meccanismi coinvolti in questi ultimi processi non sono noti.

I mastociti esprimono anche recettori Fc per le catene pesanti delle IgG e possono essere attivati dall'aggregazione delle IgG fissate. Questa reazione IgG-mediata è probabilmente alla base della suscettibilità all'anafilassi di topi knockout per la catena ε. Comunque, le IgE rimangono decisamente la principale classe di anticorpi coinvolta nelle reazioni di ipersensibilità immediata.

L'intensità dell'attivazione dei mastociti può essere variabile e diversi stimoli possono indurre un'attivazione parziale dei mastociti, con conseguente produzione di alcuni mediatori ma non di altri. Le differenze

nell’attivazione e nel tipo di mediatori rilasciati potrebbero giustificare, almeno in parte, i diversi quadri clinici con i quali si può manifestare l’attivazione dei mastociti.

Mediatori prodotti dai mastociti

Le funzioni effettrici dei mastociti sono mediate da molecole solubili rilasciate dalle cellule attivate (Fig. 20-6; vedi anche Tab. 20-2). Questi mediatori possono essere suddivisi in preformati (amine biogene e macromolecole contenute nei granuli) e neosintetizzati (mediatori lipidici e citochine).

FIGURA 20-6 Effetti biologici dei mediatori dell’ipersensibilità immediata. I mediatori prodotti dai mastociti e dai basofili comprendono le amine vasoattive e gli enzimi preformati immagazzinati nei granuli, nonché le citochine e i mediatori lipidici che vengono sintetizzati *ex novo* in seguito all’attivazione cellulare. Le amine vasoattive e i mediatori lipidici inducono permeabilità vascolare, broncocostrizione e ipermotilità intestinale, tutte componenti della risposta immediata. Le citochine e i mediatori lipidici concorrono all’infiammazione, che è invece parte della risposta di fase tardiva. Gli enzimi probabilmente contribuiscono al rimodellamento tissutale. I mastociti attivati rilasciano proteine cationiche preformate ed enzimi tossici sia per i parassiti sia per le cellule dell’ospite. Alcuni enzimi contenuti nei granuli degli eosinofili probabilmente contribuiscono al rimodellamento tissutale nelle malattie a base allergica croniche.

Amine biogene

Molti effetti biologici correlati all’attivazione dei mastociti sono mediati da amine biogene normalmente sequestrate nei granuli e dai quali vengono rilasciate. Le amine biogene, spesso denominate anche *amine vasoattive*, sono sostanze di basso peso molecolare contenenti un gruppo aminico. Nei mastociti umani il principale mediatore di questo tipo è l’**istamina**, mentre in alcuni roditori la serotonina sembra avere

un’importanza simile o maggiore. L’istamina agisce legandosi a recettori espressi sulla superficie della cellula bersaglio. A tale riguardo, diversi tipi cellulari esprimono differenti classi di recettori per l’istamina (per esempio i recettori istaminergici H_1, H_2, H_3), che possono essere distinti mediante inibitori farmacologici specifici. L’azione dell’istamina è di breve durata, poiché viene rapidamente rimossa dall’ambiente extracellulare da sistemi di trasporto specifici. Dopo essersi legata ai recettori, essa innesca eventi intracellulari, tra i quali la degradazione del fosfatidilinositolo, che porta alla produzione di IP3, e del DAG. Tali molecole possono a loro volta provocare diversi effetti in differenti tipi cellulari. In particolare, il legame dell’istamina all’endotelio causa la contrazione cellulare, con la conseguente espansione degli spazi interendoteliali e l’aumento della permeabilità endoteliale, a sua volta responsabile del passaggio del plasma nei tessuti. Sempre nelle cellule endoteliali, l’istamina stimola la sintesi di fattori come la prostaciclina (PGI_2) e l’ossido nitrico, che inducono il rilassamento della muscolatura liscia vascolare, provocando la vasodilatazione. Queste azioni sono la causa delle reazioni di tumefazione e rossore (pomfo) classiche della risposta di ipersensibilità immediata (vedi più avanti). Gli antagonisti del recettore H_1 (comunemente detti *antistaminici*) inibiscono lo sviluppo del pomfo in risposta ad allergeni intradermici o ad anticorpi anti-IgE. L’istamina causa anche la contrazione della muscolatura liscia dell’intestino e dei bronchi, contribuendo all’aumentata peristalsi intestinale e al broncospasmo associati, rispettivamente, all’ingestione di allergeni alimentari o all’inalazione di quelli aerogeni. In alcune patologie a base allergica e specialmente nell’asma, gli antistaminici non sono tuttavia efficaci. Inoltre, nell’asma la broncocostrizione è più prolungata rispetto al tempo d’azione dell’istamina, suggerendo che altri mediatori di derivazione mastocitaria siano importanti in alcune forme di ipersensibilità immediata.

Enzimi e proteoglicani

Le serine proteasi neutre, come la triptasi e la chimasi, sono i costituenti proteici più abbondanti dei granuli secretori dei mastociti e contribuiscono al danno tissutale durante le reazioni di ipersensibilità immediata. La *triptasi* è presente in tutti i mastociti umani e si ritiene che

non si trovi in alcun altro tipo cellulare. La sua presenza nei liquidi biologici umani è quindi considerata un marker di attivazione mastocitaria. La *chimasi* è presente solo in alcuni mastociti umani, costituendo un criterio per l'identificazione delle diverse sottopopolazioni mastocitarie. Le funzioni di questi enzimi *in vivo* non sono state ancora completamente chiarite; tuttavia, varie attività biologiche osservabili *in vitro* suggeriscono importanti effetti biologici anche *in vivo*. Per esempio, la triptasi degrada il fibrinogeno e attiva la collagenasi causando un danno tissutale, mentre la chimasi può convertire l'angiotensina I in angiotensina II, degradare la membrana basale dell'epidermide e stimolare la secrezione di muco. Altri enzimi presenti nei granuli dei mastociti sono la carbossipeptidasi A e la catepsina G. Anche i granuli dei basofili contengono diversi enzimi, alcuni dei quali (come le proteasi neutre) sono simili a quelli dei mastociti; altri enzimi (come la proteina basica maggiore e la lisofosfolipasi) si ritrovano invece specificamente solo nei granuli degli eosinofili.

Anche l'eparina, il condroitinsolfato e i proteoglicani sono importanti costituenti dei granuli sia dei mastociti sia dei basofili. I proteoglicani sono composti da un nucleo polipeptidico e da numerose catene laterali non ramificate di glicosaminoglicano che conferiscono loro una forte carica negativa. All'interno dei granuli i proteoglicani servono da matrici di immagazzinamento per le amine vasoattive, le proteasi e altri mediatori carichi positivamente e prevengono il loro accesso al resto della cellula. Durante la degranulazione, i mediatori vengono poi rilasciati dai proteoglicani in diverse fasi; le amine biogene si dissociano molto più rapidamente della triptasi o della chimasi. In questo modo, i proteoglicani controllano la cinetica delle reazioni di ipersensibilità immediata.

Mediatori lipidici

L'attivazione dei mastociti determina la rapida neosintesi e il rilascio di mediatori lipidici che esercitano diversi effetti sui vasi sanguigni, sulla muscolatura liscia bronchiale e sui leucociti. I più importanti sono i metaboliti dell'acido arachidonico, a sua volta prodotto mediante l'idrolisi dei fosfolipidi di membrana da parte della PLA_2 (già discussa precedentemente).

Nei mastociti il principale derivato dell'acido arachidonico generato dalla ciclossigenasi è la **prostaglandina D_2** (PGD_2) che, una volta rilasciata, si lega a recettori specifici espressi sulla superficie delle cellule della muscolatura liscia, inducendo la vasodilatazione e la broncocostrizione. La PGD_2 induce anche la chemotassi dei neutrofili e il loro reclutamento nel focolaio infiammatorio. La sintesi di PGD_2 può essere inibita da inibitori della ciclossigenasi, come l'acido acetilsalicilico e farmaci antinfiammatori non steroidei. Questi farmaci possono paradossalmente esacerbare la broncocostrizione nell'asma, poiché indirizzano l'acido arachidonico verso la produzione di leucotrieni (vedi più avanti).

I più importanti derivati dall'acido arachidonico generati dalla lipossigenasi sono i **leucotrieni**, soprattutto l'LTC_4 e suoi prodotti di degradazione LTD_4 e LTE_4. L'LTC_4 è prodotto dai basofili e dai mastociti associati alle mucose, ma non dai mastociti del tessuto connettivo. I leucotrieni interagiscono con specifici recettori espressi dalle cellule muscolari lisce distinti da quelli per la PGD_2, causando una prolungata broncocostrizione. Se vengono inoculati a livello cutaneo, i leucotrieni producono un arrossamento e una caratteristica reazione pomfoide prolungata. Nel loro insieme i leucotrieni LTC_4, LTD_4 e LTE_4 costituiscono ciò che un tempo veniva definita la *sostanza lenta dell'anafilassi* (*Slow-Reacting Substance of Anaphylaxis*, SRS-A) e si ritiene siano i principali mediatori della broncocostrizione nell'asma. Gli inibitori farmacologici della 5-lipossigenasi bloccano le reazioni anafilattiche anche in sistemi sperimentali.

Un terzo tipo di mediatore lipidico prodotto dai mastociti è il **fattore di attivazione piastrinica** (*Platelet-Activating Factor*, PAF) così chiamato in quanto originariamente descritto per la sua capacità di stimolare l'aggregazione piastrinica nel coniglio. Nei mastociti e nei basofili, il PAF viene sintetizzato mediante l'acilazione della lisogliceril-estere fosforilcolina, a sua volta derivata dall'idrolisi dei fosfolipidi di membrana da parte della PLA_2. Il PAF induce broncocostrizione diretta, retrazione delle cellule endoteliali e rilassamento della muscolatura liscia vascolare; tuttavia, essendo estremamente idrofobico, viene rapidamente degradato dalla PAF-idrolasi, un enzima plasmatico che ne controlla così l'azione

biologica. Gli inibitori farmacologici dei recettori per il PAF alleviano alcune delle manifestazioni patologiche correlate all'ipersensibilità immediata in un modello polmonare di coniglio. Più recentemente, evidenze genetiche hanno indicato come il PAF rappresenti un efficace mediatore dell'asma, poiché tale patologia si manifesta nella prima infanzia in individui portatori di un deficit genetico della PAF-idrolasi. Il PAF svolge anche un importante ruolo nella reazione di fase tardiva attraverso l'attivazione dei leucociti. In questa situazione, i basofili o le cellule dell'endotelio vascolare, stimolate dall'istamina o dai leucotrieni, rappresentano un'ulteriore fonte di PAF.

Citochine

I mastociti producono varie citochine che contribuiscono all'infiammazione allergica (la reazione di fase tardiva). Tra queste ricordiamo il TNF, l'IL-1, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-13, CCL3, CCL4 e vari fattori stimolanti le colonie come l'IL-3 e il fattore stimolante le colonie di granulociti e macrofagi (*Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor*, GM-CSF). Come già accennato, l'attivazione dei mastociti induce la trascrizione e neosintesi di queste citochine, sebbene il TNF possa ritrovarsi preformato nei granuli e quindi essere rapidamente rilasciato in seguito all'aggregazione di FcεRI. Anche i linfociti T_H2 reclutati nelle sedi delle reazioni allergiche producono alcune di queste citochine. Le citochine rilasciate da mastociti e linfociti T_H2 attivati sono le principali responsabili della reazione di fase tardiva. In particolare, il TNF attiva nell'endotelio l'espressione di molecole di adesione che, insieme alle chemochine, si rendono responsabili dell'infiltrazione di neutrofili e monociti (vedi Cap. 3). Oltre all'infiammazione allergica, le citochine prodotte dai mastociti sembrano anche contribuire alle risposte immunitarie innate alle infezioni. Per esempio, come verrà più dettagliatamente descritto, studi in modelli murini suggeriscono che i mastociti siano necessari per un'efficace difesa contro alcune infezioni batteriche e che tale funzione effettrice sia mediata principalmente dal TNF.

Proprietà degli eosinofili

Gli eosinofili sono granulociti di derivazione midollare abbondantemente presenti negli infiltrati infiammatori delle reazioni di fase tardiva e partecipano a molti dei processi patologici che sottendono le malattie a base allergica. Gli eosinofili si sviluppano nel midollo osseo e, dopo la maturazione, entrano nel circolo ematico. Il GM-CSF, l'IL-3 e l'IL-5 promuovono la maturazione degli eosinofili dai precursori mieloidi. Gli eosinofili sono normalmente presenti nei tessuti periferici, soprattutto nelle mucose degli apparati respiratorio, gastrointestinale e genitourinario. In questi tessuti, il loro numero tende ad aumentare durante il processo infiammatorio. I granuli degli eosinofili contengono proteine basiche che legano i coloranti acidi come l'eosina (vedi Tab. 20-2 e Fig. 20-2, *C*).

Le citochine prodotte dai linfociti T_H2 promuovono l'attivazione e il reclutamento degli eosinofili ai siti dove sia in corso una reazione infiammatoria di fase tardiva. Sia i linfociti T_H2 sia le cellule linfoidi innate del gruppo 2 producono IL-5, un potente attivatore degli eosinofili, nei quali induce la degranulazione. Inoltre, IL-5 promuove la loro maturazione dai precursori midollari. In assenza dell'IL-5 (per esempio nei topi knockout per il gene che la codifica), si osserva un deficit numerico e funzionale di eosinofili. Gli eosinofili vengono reclutati nelle sedi in cui sia attiva una reazione infiammatoria di fase tardiva o dove sia presente un'infezione da elminti. Qui il loro reclutamento è mediato dalle interazioni fra le molecole di adesione e le chemochine. Gli eosinofili si legano alle cellule endoteliali che esprimono la E-selectina e VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*), il ligando per l'integrina VLA-4. L'IL-4 prodotta dai linfociti T_H2 aumenta l'espressione di tali molecole di adesione. Il richiamo degli eosinofili nei tessuti dipende anche da CCL11 (eotassina) prodotta dalle cellule epiteliali presenti nelle sedi delle reazioni allergiche e che si lega al recettore CCR3 espresso costitutivamente dagli eosinofili. Anche il frammento del complemento C5a e i mediatori lipidici PAF ed LTB_4, sintetizzati dai mastociti, agiscono da molecole chemotattiche per gli eosinofili.

Gli eosinofili rilasciano proteine dei granuli che sono tossiche per i parassiti elmintici ma possono anche danneggiare i tessuti. Gli eosinofili esprimono recettori per Fc delle IgG, IgA e IgE e la loro attivazione

avviene presumibilmente in risposta all'aggregazione dei recettori per Fc che viene indotta quando gli anticorpi ad essi associati legano antigeni multivalenti. Negli eosinofili umani, FcεRI è privo della catena β (un importante componente del sistema di trasduzione del segnale); non è quindi chiaro se queste cellule possano degranulare in modo efficace in risposta all'aggregazione delle IgE. Il contenuto dei granuli degli eosinofili comprende idrolasi lisosomiali analoghe a quelle di altri granulociti ma anche proteine specifiche di questo tipo cellulare, come la proteina basica maggiore e la proteina cationica che, nonostante non svolgano funzioni enzimatiche note, risultano particolarmente tossiche per gli elminti e per i batteri ma anche per i tessuti circostanti. I granuli degli eosinofili contengono anche la perossidasi eosinofila, distinta dalla mieloperossidasi dei neutrofili, che catalizza la produzione di acido ipocloridrico o di acido ipobromidrico, anch'essi tossici per elminti, protozoi e cellule dell'ospite.

Analogamente ai mastociti e ai basofili, gli eosinofili attivati producono e rilasciano mediatori lipidici, tra i quali PAF, prostaglandine e leucotrieni (LTC_4, LTD_4 e LTE_4). L'importanza dei mediatori lipidici di derivazione eosinofila nell'ipersensibilità immediata non è ben chiara, ma è probabile che essi contribuiscano ai processi patologici delle malattie a base allergica. Gli eosinofili producono inoltre un gruppo di citochine che possono promuovere la risposta infiammatoria, ma il significato biologico di questa azione non è noto.

REAZIONI ATTIVATE DALLE IgE E DAI MASTOCITI

Le cellule e i mediatori che abbiamo finora descritto sono responsabili delle modificazioni emodinamiche immediate e delle risposte infiammatorie tardive che si verificano nel corso delle reazioni allergiche. Nei paragrafi seguenti, descriveremo nel dettaglio tali reazioni immediate e tardive (Fig. 20-7).

FIGURA 20-7 Reazione immediata e di fase tardiva. A. Cinetica. In un individuo precedentemente sensibilizzato, la risposta immediata all'allergene a livello vascolare e del muscolo liscio si sviluppa entro pochi

minuti dalla riesposizione all'allergene, mentre la reazione di fase tardiva si presenta 2-24 ore più tardi. **B-C.** Morfologia. La reazione immediata (**B**) è caratterizzata da vasodilatazione, congestione ed edema. La reazione tardiva (**C**) è caratterizzata invece da un infiltrato infiammatorio ricco in eosinofili, neutrofili e linfociti T. (*Per gentile concessione del Dr. Daniel Friend, Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts.*)

Reazione immediata

I cambiamenti vascolari che si verificano precocemente durante le reazioni di ipersensibilità immediata sono ben evidenziabili nella reazione pomfoide che avviene in risposta all'inoculo intradermico di un allergene (Fig. 20-8). Quando un individuo che è stato precedentemente esposto a un allergene e ha quindi prodotto IgE specifiche viene sottoposto a un richiamo mediante un'ulteriore iniezione intradermica dello stesso antigene, il sito d'inoculo si arrossa, a causa della vasodilatazione locale, e si gonfia rapidamente, a causa della fuoriuscita di plasma dalle venule. Questa tumefazione morbida è detta **pomfo** e può riguardare un'area cutanea di svariati centimetri di diametro. Successivamente, i vasi sanguigni ai margini del pomfo si dilatano e appaiono congestionati per la presenza di globuli rossi, fino a produrre una caratteristica formazione arrossata periferica definita **eritema**. L'arrossamento e la tumefazione raggiungono il loro apice entro 5-10 min dalla somministrazione dell'antigene e di solito recedono in meno di 1 ora.

FIGURA 20-8 Reazione pomfoide cutanea. A. In risposta al rilascio dei mediatori dei mastociti indotto dallo stimolo antigenico, i vasi sanguigni locali inizialmente si dilatano e poi diventano permeabili a fluidi e macromolecole. Ciò provoca arrossamento e tumefazione locale (pomfo). La conseguente dilatazione dei vasi ai limiti del rigonfiamento provoca la comparsa di un margine arrossato (eritema). **B.** Fotografia di una tipica reazione pomfoide cutanea in risposta all'inoculo di un allergene. (*Per gentile concessione del Dr. James D. Faix, Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Palo Alto, California.*)

La reazione pomfoide ed eritematosa dipende dalle IgE e dai mastociti. L'esame istologico mostra che i mastociti nell'area del pomfo e dell'eritema hanno degranulato rilasciando i mediatori preformati. L'associazione causa/effetto esistente tra IgE e mastociti e l'ipersensibilità immediata fu inizialmente dedotta da esperimenti di trasferimento passivo di IgE da un individuo allergico a un ricevente normale. In queste condizioni, le reazioni di ipersensibilità immediata verso un dato antigene possono essere stimolate localmente anche in soggetti non allergici mediante l'inoculo cutaneo di IgE provenienti da un individuo allergico. Tali esperimenti furono originariamente eseguiti con siero ottenuto da soggetti vaccinati e il fattore sierico responsabile della reazione fu definito *reagina*. Per questa ragione, ancora oggi le IgE sono chiamate *anticorpi reaginici*. La reazione cutanea innescata dall'antigene nel trasferimento adottivo di IgE è detta *anafilassi cutanea passiva*.

La reazione pomfoide deriva dalla sensibilizzazione dei mastociti del derma da parte di IgE legate a FcεRI, dall'aggregazione delle IgE dipendente dall'antigene e dall'attivazione dei mastociti con il rilascio di mediatori, principalmente l'istamina. Questa si lega ai recettori espressi sulle cellule endoteliali delle venule che, conseguentemente, sintetizzano e rilasciano PGI_2, ossido nitrico e PAF. Come già accennato, questi mediatori causano la vasodilatazione e la fuoriuscita di plasma. Sembra che i mastociti della cute producano solo piccole quantità di mediatori ad azione prolungata (come i leucotrieni), cosicché la reazione pomfoide scompare rapidamente. I test allergologici utilizzati in clinica si basano sulla capacità dei diversi antigeni di provocare una reazione pomfoide quando vengono applicati sulla cute attraverso un cerotto a lento rilascio o quando sono somministrati attraverso piccole iniezioni superficiali.

Reazione di fase tardiva

Entro 2-4 ore, la formazione del pomfo è seguita da una reazione tardiva che consiste nell'accumulo di neutrofili, eosinofili, basofili e linfociti helper (vedi Fig. 20-7). L'infiammazione raggiunge il suo apice intorno alle 24 ore, per poi recedere gradualmente. Così come la reazione pomfoide, anche la capacità di attivare una risposta tardiva può essere trasferita passivamente mediante le IgE. La stessa reazione può essere innescata

anche da agenti che attivano i mastociti o da anticorpi anti-IgE che inducono l'aggregazione dei recettori FcεR1 già complessati con IgE. Le citochine prodotte dai mastociti (come il TNF) inducono nell'endotelio l'espressione di molecole di adesione come la E-selectina e la molecola di adesione intercellulare-1 (*Inter Cellular Adhesion Molecule 1*, ICAM-1); in questo modo la degranulazione dei mastociti può indurre l'espressione di molecole di adesione sulle cellule endoteliali vascolari, che a loro volta favoriscono l'afflusso dei leucociti nei tessuti. I tipi di leucociti maggiormente coinvolti nelle reazioni di fase tardiva sono gli eosinofili e i linfociti T helper. Sebbene durante il normale decorso delle reazioni di fase tardiva i linfociti T_H2 siano la sottopopolazione più coinvolta, nella dermatite atopica e nell'asma si riscontrano anche linfociti T_H1 e T_H17, così come linfociti T che producono sia IL-17 sia IFNγ. Anche i neutrofili sono spesso presenti. Sia gli eosinofili sia i linfociti T_H2 esprimono CCR4 e CCR3, mentre le chemochine che legano questi recettori sono prodotte da molti diversi tipi cellulari (incluse le cellule epiteliali) presenti nei siti ove avvengono le reazioni di ipersensibilità immediata.

La reazione di fase tardiva può verificarsi anche in assenza di una precedente e conclamata reazione di ipersensibilità immediata. L'asma bronchiale e l'eczema sono malattie nelle quali possono verificarsi ripetuti episodi infiammatori con accumulo di eosinofili e di linfociti T_H2 in assenza di quelle modificazioni vascolari caratteristiche della reazione pomfoide immediata. Queste condizioni patologiche sono caratterizzate da un basso livello di attivazione dei mastociti, dato che le citochine che inducono la reazione cronica di fase tardiva probabilmente sono prodotte dai linfociti T.

BASI GENETICHE DELLA PREDISPOSIZIONE ALLE ALLERGIE

La propensione a sviluppare allergie dipende anche dalla trasmissione genetica. Si osservano spesso in gruppi familiari livelli abnormi di IgE in associazione con l'atopia. Lo studio di questi soggetti ha evidenziato una chiara trasmissione autosomica dell'atopia, pur essendo tale ereditarietà probabilmente multigenica. In una stessa famiglia, gli organi bersaglio

dell’atopia possono variare. Così, la febbre da fieno, l’asma e l’eczema possono presentarsi sotto diversa forma in diversi membri della stessa famiglia. Tutti questi soggetti, tuttavia, presenteranno concentrazioni plasmatiche di IgE superiori alla norma.

Vari approcci sono stati intrapresi per identificare le varianti alleliche dei geni che aumentano il rischio di malattie a base allergica, inclusa la clonazione posizionale, l’identificazione e caratterizzazione di geni candidati e studi di associazione sull’intero genoma. Grazie a queste metodologie si sono potuti identificare numerosi geni associati a un’aumentata suscettibilità all’asma e ad altre malattie atopiche (Tabella 20-3). Basandosi sulle funzioni note delle proteine codificate da molti dei geni identificati, si sono potute formulare varie ipotesi riguardo ai meccanismi attraverso i quali l’espressione o l’attività alterata di tali proteine possono influenzare l’insorgere o la gravità delle malattie a base allergica. Tuttavia, rimane da dimostrare formalmente la possibilità che i polimorfismi genetici associati a un elevato rischio di allergia alterino significativamente l’espressione o la funzione delle proteine codificate. Allo stesso modo, rimangono da caratterizzare i meccanismi attraverso i quali le funzioni delle proteine codificate da tali geni possono influenzare lo sviluppo dell’allergia.

TABELLA 20-3 Esempi di geni associati con l’atopia e l’asma

Geni candidati o proteina codificata	Localizzazione cromosomica	Malattia associata	Ruolo putativo dei prodotti genici nella malattia
Cluster dei geni codificanti per citochine (IL-4, IL-5, IL-13), CD14, recettori β_2-adrenergici	5q	Asma	L’IL-4 e l’IL-13 promuovono lo scambio delle IgE, mentre l’IL-5 promuove la crescita e l’attivazione degli eosinofili; CD14 è un componente del complesso recettoriale per l’LPS che, interagendo con il

			TLR4, può modulare l’equilibrio tra le risposte T_H1 e T_H2; i recettori b2-adrenergici regolano la contrazione della muscolatura liscia bronchiale
MHC di classe II	6p	Asma	Alcuni alleli possono regolare la capacità dei linfociti T di rispondere agli allergeni
Catena FcεRI β	11q	Asma	Media l’attivazione dei mastociti
Fattore della cellula staminale, interferone γ, STAT6	12q	Asma	Il fattore della cellula staminale regola la crescita e la differenziazione dei mastociti; l’IFN-g contrasta le attività dell’IL-4; lo STAT6 trasduce il segnale dell’IL-4
Catena α del recettore dell’IL-4	16		Subunità comune ai recettori per l’IL-4 e l’IL-13
ADAM33	20p	Asma	Metalloproteinasi coinvolte nel rimodellamento delle vie aeree
DPP10	2q14	Asma	Peptidasi coinvolta nel controllo dell’attività di citochine e chemochine
PHF11	13q	Asma	Fattore trascrizionale

			coinvolto nell’espansione clonale B e nell’espressione di Ig
ORMDL3	17q	Asma	Risposta infiammatoria da stress del RE
“IL-1 receptor-like 1” (recettore per IL-33)	2q	Asma	IL-33 induce la produzione di citochine T_H2 da parte di linfociti T, mastociti, eosinofili e cellule linfoidi innate
Fosfodiesterasi 4D	5q	Asma	Degrada l’AMPc e regola la contrattilità delle cellule muscolari lisce dell’apparato respiratorio
Filaggrina	1q	Dermatite atopica	Componente dei cheratinociti differenziati importante per il funzionamento della barriera epiteliale

RE, reticolo endoplasmatico.

Uno dei primi risultati significativi degli studi genetici sulle allergie è stato l’identificazione di un locus di suscettibilità all’atopia sul cromosoma 5q, prossimale al cluster dei geni per le citochine IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 e per il recettore per l’IL-4. Questa regione riveste un grande interesse a causa delle connessioni che potrebbero esistere tra molti dei geni lì localizzati, la regolazione della produzione di IgE e la crescita e la differenziazione dei mastociti e degli eosinofili. Inoltre, i vari polimorfismi del gene che codifica per l’IL-9 sono stati associati all’asma bronchiale nell’uomo e, in effetti, questa citochina può indurre l’infiammazione delle vie aeree in modelli sperimentali di asma. Nel corso di uno studio di associazione

genica sull'intero genoma rivolto alla comprensione della suscettibilità all'asma sono stati anche identificati i loci contenenti il gene codificante per IL-33 e per il suo recettore (IL1R1). IL-33 induce la produzione di citochine di tipo T_H2 in vari tipi cellulari, incluse le cellule linfoidi innate. Infine, mutazioni ipomorfe identificate nel gene che codifica per la filaggrina, una nota proteina di barriera della pelle e dell'esofago, aumentano il rischio di sensibilizzazione agli allergeni e di conseguenza le risposte IgE e la malattia atopica.

Alcuni geni i cui prodotti regolano le risposte immunitarie innate alle infezioni sono stati associati all'allergia e all'asma in particolare. Tali molecole comprendono CD14, un componente del recettore per i lipopolisaccaridi, e i recettori Toll-like TLR2 e TLR4. Poiché una forte risposta immunitaria innata alle infezioni solitamente favorisce lo sviluppo di risposte T_H1 e inibisce quelle T_H2 (vedi Cap. 10), è possibile che i polimorfismi o le mutazioni che determinano un aumento o un'attenuazione delle risposte innate ai più comuni microrganismi infettivi influenzino il rischio di sviluppare l'atopia. Altri studi studi di associazione sull'intero genoma hanno riscontrato una significativa correlazione tra varianti comuni di numerosi altri geni e l'asma e altre malattie atopiche. Ciononostante, ad oggi, le funzioni dei prodotti di tali geni o la relazione tra le loro funzioni note e lo sviluppo della malattia atopica rimangono sconosciute.

Allergie e fattori ambientali

È ormai chiaro che, in sinergia con fattori genetici, diversi fattori ambientali hanno un significativo impatto sullo sviluppo delle allergie. Tali fattori includono l'esposizione ad allergeni e a microrganismi infettivi e forse anche altri fattori che regolano la corretta azione di barriera delle mucose, come l'inquinamento atmosferico. Inoltre, sembra essere particolarmente importante il momento dell'esposizione ai fattori ambientali, specialmente se questa avviene in giovane età.

L'esposizione a microrganismi durante la prima infanzia potrebbe ridurre il rischio di sviluppo delle allergie. Una possibile spiegazione della maggiore prevalenza di asma e altre malattie atopiche nelle nazioni

industrializzate è da ricercarsi nell'evidenza che in tali nazioni la frequenza delle infezioni microbiche è generalmente bassa. Vari dati epidemiologici dimostrano che l'esposizione nella prima infanzia a microrganismi ambientali, più frequentemente presenti nelle campagne ma non nelle città, si associa a una minore insorgenza di malattie allergiche. Sulla base di questi dati, è stata proposta la cosiddetta **ipotesi igienica**, secondo la quale l'esposizione in giovane età a infezioni o a microrganismi commensali intestinali determina una maturazione del sistema immunitario opportunamente rivolta allo sviluppo precoce di linfociti T regolatori cosicché, da adulti, questi individui attiveranno con minore probabilità risposte T_H2 ad antigeni ambientali non infettivi, avendo di conseguenza minore probabilità di sviluppare malattie a base allergica.

Le infezioni respiratorie virali e batteriche sono un fattore predisponente allo sviluppo dell'asma o all'esacerbazione di episodi asmatici preesistenti. Si stima al riguardo che le infezioni virali alle vie respiratorie precedano fino all'80% degli attacchi di asma pediatrici. I meccanismi attraverso i quali tali infezioni stimolano prevalentemente la risposta da parte dei linfociti T_H2 e dei mastociti non è ancora ben compreso.

MALATTIE A BASE ALLERGICA NELL'UOMO: PATOGENESI E TERAPIA

La degranulazione dei mastociti rappresenta l'evento cruciale di molte malattie a base allergica. D'altra parte, le manifestazioni clinicopatologiche con le quali tali malattie si manifestano dipendono dai tessuti in cui agiscono i mediatori rilasciati dai mastociti e dall'eventuale cronicizzazione del processo infiammatorio. Gli individui atopici possono presentare una o più manifestazioni associate alle patologie a base allergica. Le forme più frequenti sono la rinite allergica (febbre da fieno), l'asma bronchiale, la dermatite atopica (eczema) e le allergie alimentari. Le caratteristiche clinicopatologiche delle reazioni allergiche variano al variare della sede anatomica in cui esse avvengono. La via d'ingresso dell'allergene può definire gli organi o i tessuti coinvolti. Per esempio, gli antigeni inalati causeranno rinite o asma, quelli ingeriti vomito e diarrea (ma possono anche produrre sintomi cutanei e respiratori se vengono

ingerite dosi di antigene più elevate), quelli iniettati avranno effetti sistemici sulla circolazione. La concentrazione dei mastociti nei vari organi bersaglio influenza la gravità delle risposte. I mastociti sono particolarmente abbondanti nella cute e nelle mucose respiratoria e gastrointestinale e in effetti questi tessuti sono quelli più frequentemente interessati dai danni conseguenti alle reazioni di ipersensibilità immediata. Le caratteristiche dei mastociti interessati possono influenzare l'andamento della reazione di ipersensibilità immediata. Per esempio, i mastociti del tessuto connettivo ricchi di istamina sono responsabili della reazione pomfoide a livello cutaneo.

Di seguito tratteremo le principali caratteristiche delle malattie a base allergica che si manifestano nei diversi tessuti.

Anafilassi sistemica

L'anafilassi è una reazione di ipersensibilità immediata di tipo sistemico caratterizzata da edema diffuso e ipotensione causata da un'intensa e diffusa vasodilatazione. Questi effetti sono classicamente determinati da un antigene introdotto tramite iniezioni, punture d'insetto o da assorbimento attraverso una superficie epiteliale come la mucosa intestinale. L'allergene attiva i mastociti in molti tessuti contemporaneamente, provocando la liberazione di mediatori che diffondono nel letto vascolare di tutti i distretti corporei. La riduzione del tono vascolare e la perdita di plasma provocate da mediatori di derivazione mastocitaria possono portare a una significativa riduzione della pressione arteriosa definita *shock anafilattico*, spesso fatale. Gli effetti a livello cardiovascolare sono accompagnati da costrizione delle vie aeree superiori e inferiori, ipersensibilità dell'intestino, ipersecrezione di muco nell'intestino e nei bronchi e manifestazioni orticarioidi (orticaria) della cute. Non è ben chiaro quali siano i mediatori più importanti nello shock anafilattico. La terapia d'obbligo in questi casi è la somministrazione di adrenalina per via sistemica che, interrompendo gli effetti broncocostrittori e vasodilatatori dei mediatori rilasciati dai mastociti, può costituire un salvavita. L'adrenalina migliora anche la gittata cardiaca, aumentando la probabilità di sopravvivenza al temuto collasso circolatorio. Anche gli antistaminici possono essere di beneficio nell'anafilassi, suggerendo un importante ruolo dell'istamina in questa reazione.

Asma bronchiale

L'asma è una malattia infiammatoria causata da ripetute reazioni di ipersensibilità immediate e reazioni allergiche di fase tardiva nel polmone che causano una triade clinicopatologica caratterizzata da episodi reversibili ma intermittenti di ostruzione delle vie aeree, infiammazione bronchiale cronica con eosinofilia e ipertrofia delle cellule muscolari lisce bronchiali con ipereattività ai broncocostrittori (Fig. 20-9). I pazienti lamentano attacchi parossistici di broncocostrizione e abbondante produzione di muco denso, che portano all'ostruzione bronchiale ed esacerbano le difficoltà respiratorie. L'asma coesiste spesso con broncopneumopatia cronica ostruttiva e dalla combinazione di queste due patologie possono scaturire gravi episodi di ostruzione irreversibile delle vie aeree. Gli individui affetti sono esposti a un'elevata morbilità. Inoltre, l'asma può anche risultare fatale. L'asma colpisce circa 20 milioni di persone negli Stati Uniti e la sua incidenza, significativamente aumentata negli ultimi anni, è comunque simile a quella di altre nazioni industrializzate, anche se può essere inferiore in aree geografiche meno sviluppate.

Circa il 70% dei casi di asma è dovuto a reazioni mediate dalle IgE che indicano la presenza di atopie. Nel rimanente 30% di pazienti, l'asma può non essere associato ad atopie, essendo piuttosto provocato da stimoli di natura non immunologica come farmaci, basse temperature ed esercizio fisico. Negli asmatici non atopici, la patogenesi della costrizione delle vie aeree rimane simile a quella degli individui atopici, indicando come i meccanismi alternativi di degranulazione dei mastociti (per esempio mediante la produzione locale di neurotrasmettitori) possano scatenare la malattia.

FIGURA 20-9 Caratteristiche istopatologiche dell'asma bronchiale. L'asma bronchiale atopico è causato da ripetute reazioni di ipersensibilità immediata a livello polmonare accompagnate da reazioni croniche di fase tardiva. In figura sono mostrate sezioni trasverse di un bronco normale (**A**) e di un bronco di un paziente affetto da asma (**B**). Il bronco patologico

presenta un'eccessiva produzione di muco (M), ipertrofia del muscolo liscio (ML), numerose cellule infiammatorie (compresi gli eosinofili) nella sottomucosa e molte più cellule caliciformi (cellule di Goblet) rispetto a un bronco normale (*indicate dalle frecce nere nell'inserto*). (*Da Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM: The development of allergic inflammation, Nature 454:445-454, 2008. Per gentile concessione di G.J. Berry, Stanford University, California.*)

L'asma atopico è innescato dall'attivazione dei mastociti in risposta al legame dell'allergene alle IgE e dall'attivazione dei linfociti T_H2 in risposta allo stesso allergene (Fig. 20-10). I mediatori lipidici prodotti dai mastociti e dai linfociti T portano al reclutamento di eosinofili, basofili e ulteriori linfociti T_H2. L'infiammazione cronica nell'asma atopico può continuare senza l'attivazione dei mastociti. Esistono evidenze sperimentali che altre sottopopolazioni di linfociti T (inclusi i T_H1, i T_H17 e i linfociti T secernenti l'IL-9) contribuiscono alle manifestazioni della malattia conclamata. L'ipertrofia delle cellule muscolari lisce e la loro ipereattività potrebbero essere causate da mediatori e citochine di derivazione leucocitaria. I mastociti, i basofili e gli eosinofili sono infatti in grado di produrre tutti i mediatori che inducono costrizione nelle fibrocellule muscolari lisce respiratorie, quali LTC_4, LTD_4 e LTE_4. In alcune sperimentazioni cliniche, gli antagonisti di LTC_4 o dei recettori dei leucotrieni hanno efficientemente ridotto la costrizione delle vie aeree indotta dagli allergeni. L'aumento della secrezione di muco è invece causato dall'azione di alcune citochine, principalmente dall'IL-13, sulle cellule dell'epitelio bronchiale.

FIGURA 20-10 Mediatori e terapia dell'asma. I leucotrieni di derivazione mastocitaria e il fattore attivante le piastrine (PAF) sono considerati i principali mediatori della broncocostrizione acuta. La terapia di tale patologia è rivolta sia a ridurre l'attivazione dei mastociti (con inibitori come il sodio cromo-glicato) sia a contrastare l'azione di questi mediatori sulla muscolatura liscia bronchiale (mediante broncodilatatori come gli agonisti dei recettori β-adrenergici somministrati per via

inalatoria). Questi farmaci inibiscono anche l'attivazione dei mastociti. Le citochine di derivazione mastocitaria sono ritenute i principali responsabili dell'intensa infiammazione respiratoria, che è un classico esempio di reazione di fase tardiva; la terapia corticosteroidea è utilizzata per inibire la sintesi delle citochine. Le citochine possono inoltre essere prodotte da linfociti T helper (non mostrato in figura).

L'attuale terapia ha due principali obiettivi: la profilassi e il controllo dell'infiammazione (con particolare riferimento al rilassamento delle cellule muscolari lisce degli epiteli respiratori) (Fig. 20-10). Negli ultimi anni si assiste a una spiccata tendenza all'utilizzo, come principale trattamento, di agenti antinfiammatori. Diverse classi di questi farmaci sono in uso corrente. Tra questi, i corticosteroidi che, somministrati per inalazione, bloccano la produzione di citochine infiammatorie, mentre la loro somministrazione per via sistemica è particolarmente indicata per ridurre l'infiammazione in caso di una crisi allergica acuta. Il rilassamento della muscolatura liscia bronchiale (che previene il broncospasmo) si ottiene principalmente mediante la somministrazione di farmaci che inducono un aumento dei livelli di adenosina monofosfato ciclico (AMPc), noto per inibire la contrazione delle cellule muscolari lisce. Tra i principali farmaci di questo tipo ci sono gli attivatori dell'adenilato ciclasi, che agiscono legandosi ai recettori β_2-adrenergici. La teofillina, somministrata oralmente, inibisce l'azione degli enzimi fosfodiesterasici che degradano l'AMPc e un tempo era ampiamente utilizzata, ma oggi sempre più frequentemente sostituita dai β_2-agonisti per via inalatoria a lunga durata d'azione, che sono più efficaci e meno tossici. Gli inibitori dei leucotrieni agiscono invece bloccando il legame di questi mediatori alle cellule muscolari lisce delle vie aeree prevenendo il broncospasmo. Anticorpi monoclonali umanizzati anti-IgE sono stati recentemente approvati come terapia per ridurre efficacemente i livelli di IgE nei pazienti atopici. Poiché l'istamina ha un ruolo modesto nella broncocostrizione, gli antistaminici (H1-antagonisti) non sono utili nel trattamento dell'asma. Inoltre, dato che molti antistaminici sono anche anticolinergici, essi possono addirittura peggiorare l'ostruzione delle vie respiratorie causando l'aumento delle secrezioni di muco.

Reazioni di ipersensibilità immediata nel tratto respiratorio superiore, nel tratto gastrointestinale e nella cute

La **rinite allergica**, definita anche *febbre da fieno*, è forse la più comune patologia a base allergica ed è una conseguenza delle reazioni di ipersensibilità immediata verso allergeni comuni (per esempio pollini e polveri domestiche da acari) che interessano le vie aeree dopo la loro inalazione. Le manifestazioni clinicopatologiche della rinite allergica comprendono edema della mucosa associato a infiltrazione leucocitaria (principalmente eosinofili), ipersecrezione di muco, tosse e difficoltà respiratorie. La congiuntivite allergica con prurito oculare è spesso associata alla rinite. Nei pazienti che presentano episodi ripetuti di rinite allergica possono svilupparsi protrusioni focali della mucosa nasale, definite *polipi nasali*, ricche di fluido e di eosinofili. I più comuni farmaci usati per trattare la rinite allergica sono gli antistaminici.

Le **allergie alimentari** sono causate da reazioni di ipersensibilità immediata nei confronti di alcuni alimenti che inducono il rilascio di mediatori da parte dei mastociti mucosali e submucosali del tratto gastrointestinale, inclusa l'orofaringe. Le manifestazioni cliniche associate alle allergie alimentari includono prurito, edema tissutale, aumento della peristalsi e aumento della secrezione di liquidi da parte degli epiteli, con i sintomi ad esso associati quali gonfiore orofaringeo, vomito e diarrea. Anche rinite, orticaria, lieve broncospasmo e, meno frequentemente, reazioni anafilattiche sistemiche si associano alle reazioni allergiche agli alimenti, suggerendo che gli antigeni alimentari possano anche agire a livello sistemico una volta entrati in circolo. Sono state descritte reazioni allergiche a svariati alimenti, tra i quali i più comuni sono le arachidi e i crostacei. Alcuni individui possono essere sufficientemente sensibili a questi allergeni da sviluppare gravi reazioni sistemiche in risposta anche a piccole ingestioni accidentali.

Le reazioni allergiche cutanee più comuni sono l'**orticaria** e la **dermatite atopica**. L'orticaria è una reazione pomfoide acuta indotta dai mediatori dei mastociti e si manifesta in risposta a un contatto diretto con l'allergene o dopo il suo ingresso in circolo. Poiché la reazione che ne deriva è principalmente dovuta all'istamina, gli antistaminici (antagonisti del

recettore H_1) attenuano tale risposta e sono alla base della sua terapia. L'orticaria può persistere per diverse ore o giorni. La dermatite atopica (chiamata anche comunemente eczema) fa parte della cosiddetta "triade atopica" (dermatite atopica, rinite allergica e asma) ma può verificarsi anche come episodio isolato. Si tratta di un disturbo cutaneo comune che può essere causato da una reazione di fase tardiva a un allergene cutaneo. In questo tipo di risposta, il TNF, l'IL-4 e altre citochine (probabilmente prodotte dai linfociti T_H2 e dai mastociti) agiscono sull'endotelio venulare promuovendo l'infiammazione. Come ci si può attendere da una risposta causata dalle citochine, la reazione infiammatoria di fase tardiva non può essere inibita dagli antistaminici, mentre può essere bloccata dal trattamento con corticosteroidi, in grado di impedire la sintesi delle citochine. I bambini affetti da deficit del funzionamento della barriera cutanea dovuta a mutazioni del gene che codifica per la filaggrina sono altamente suscettibili alla dermatite atopica e sviluppano frequentemente anche asma.

Immunoterapia delle malattie a base allergica

In aggiunta alle terapie mirate a contenere le conseguenze dell'ipersensibilità immediata descritte sopra, gli immunologi clinici tentano di limitare l'insorgenza delle reazioni allergiche nel paziente con trattamenti volti a un'opportuna modulazione della risposta immunitaria specifica per l'allergene. A questo scopo sono stati messi a punto diversi protocolli empirici di immunoterapia la cui efficacia si correla a svariati cambiamenti della risposta allergica. In uno di questi, definito **desensibilizzazione**, vengono somministrate per via sottocutanea quantità piccole ma crescenti di antigene, ottenendo come risultato la diminuzione della concentrazione di IgE specifiche e l'aumento di IgG che, a loro volta, potrebbero contribuire a inibire la produzione di IgE, neutralizzando l'antigene e inducendo una reazione di feedback anticorpale (vedi Cap. 12). È anche possibile che la desensibilizzazione possa indurre una specifica tolleranza nei linfociti T o possa cambiare il fenotipo predominante dei linfociti T antigene-specifici da T_H2 a T_H1. Non esistono comunque chiare evidenze a sostegno di tale ipotesi. Anzi, l'osservazione che gli effetti benefici della desensibilizzazione possono presentarsi nel giro di qualche

ora (quindi prima delle modificazioni della concentrazione di IgE) suggerisce l'esistenza di altri effetti biologici. Comunque, nonostante l'esatto meccanismo d'azione sia sconosciuto, la desensibilizzazione è efficace nel prevenire risposte anafilattiche acute verso antigeni proteici (per esempio il veleno degli insetti) o farmaci (per esempio la penicillina). Va tuttavia notato che, per quanto i pazienti affetti dalle forme di atopia cronica più comuni (febbre da fieno e asma) possano effettivamente beneficiare della terapia di desensibilizzazione, l'efficacia di questo trattamento nei disturbi allergici è alquanto variabile.

Altri approcci utilizzati per modificare la risposta immunitaria agli allergeni includono la somministrazione sistemica di anticorpi monoclonali umanizzati anti-IgE, già menzionata prima, e la somministrazione di un anticorpo diretto contro la subunità condivisa dai recettori per IL-4 e IL-3, che si è dimostrato efficace in studi clinici condotti su un sottogruppo di pazienti affetti da asma e dermatite atopica. Gli anticorpi anti-IL4 e IL-5 sono anch'essi oggetto di sperimentazioni cliniche.

RUOLO PROTETTIVO DELLE RISPOSTE IMMUNITARIE ATTIVATE DALLE IgE E DAI MASTOCITI

Molte delle nostre conoscenze sulle reazioni mediate da IgE e mastociti sono relative alle patologie da ipersensibilità; nonostante ciò è logico supporre che esse si siano evolutivamente sviluppate per svolgere funzioni protettive. Tale possibilità è supportata dalla correlazione esistente tra alcuni tipi di infezioni e livelli elevati di IgE ed eosinofilia. In accordo, studi su topi con deficit di IgE, di citochine T_H2 o di mastociti hanno effettivamente dimostrato che le risposte mediate da IgE e mastociti sono importanti nella difesa contro alcuni tipi di infezione.

Un'importante funzione protettiva è l'eradicazione dei parassiti elmintici, che rappresenta la nostra principale difesa contro questi organismi (Fig. 20-11; vedi anche Cap. 10). In questo ambito, l'azione dell'IL-4 e dell'IL-13 nella produzione di IgE e dell'IL-5 nell'attivazione degli eosinofili contribuisce a una difesa coordinata contro gli elminti. Inoltre, è stato anche ipotizzato che l'attivazione dei mastociti da parte delle IgE nel tratto

gastrointestinale promuova l'espulsione dei parassiti mediante l'aumento della peristalsi e della produzione di muco. Altre ricerche sperimentali nel topo hanno confermato il ruolo protettivo delle IgE e dei mastociti. Per esempio, topi trattati con anticorpi anti-IL-4 e topi knockout per il gene che codifica per la stessa citochina non producono le IgE e sembrano essere meno resistenti di quelli normali verso alcune infezioni elmintiche. Topi knockout per il gene che codifica per l'IL-5 sono incapaci di attivare gli eosinofili e mostrano un'aumentata suscettibilità ad alcune infezioni elmintiche. Inoltre, i topi geneticamente deficienti privi di mastociti mostrano una maggiore suscettibilità a infezioni da larve di zecca. Infine, in questi stessi topi può essere indotta una risposta immunitaria mediante il trasferimento contemporaneo di mastociti e di IgE specifiche (ma non di una sola di tali componenti). In queste condizioni, le larve vengono eradicate dalla reazione di fase tardiva.

FIGURA 20-11 Uccisione degli elminti da parte di eosinofili attivati. L'IL-5 prodotta dai linfociti T_H2 potenzia la capacità citotossica degli eosinofili. L'aggregazione degli FcεRI presenti sulla membrana degli eosinofili, causata dal legame delle IgE agli antigeni degli elminti, causa anche la deframmentazione e il rilascio da parte degli esofinofili di enzimi tossici per i parassiti.

I mastociti svolgono un importante ruolo protettivo nell'ambito della risposta immunitaria innata verso le infezioni batteriche e i veleni. Studi nel topo hanno dimostrato che in corso di infezioni batteriche acute i mastociti possono essere attivati da meccanismi indipendenti dalle IgE e che i mediatori rilasciati da queste cellule sono essenziali per la rimozione dell'infezione. Rispetto ai topi normali, i topi privi di mastociti mostrano una ridotta capacità di risolvere le infezioni e muoiono più facilmente a causa di infezioni batteriche acute del peritoneo. Nella reazione di fase tardiva, il ruolo protettivo dei mastociti è mediato dal TNF attraverso il reclutamento dei neutrofili nel peritoneo. I meccanismi mediante i quali i mastociti vengono attivati durante le risposte immunitarie innate alle infezioni batteriche non sono noti, ma possono coinvolgere l'attivazione del complemento e il conseguente rilascio del frammento C5a, che stimola

direttamente la loro degranulazione. È anche possibile che la via classica del complemento sia attivata da anticorpi naturali prodotti da linfociti B-1 che riconoscono i più comuni microrganismi patogeni. I prodotti batterici possono anche attivare i mastociti legando e attivando i recettori Toll-like presenti su queste cellule.

Nel topo, è stato dimostrato che le proteasi prodotte dai mastociti sono in grado di inattivare il veleno di alcuni serpenti e insetti e che le IgE specifiche per il veleno conferiscono una protezione dall'avvelenamento. Ciò rappresenta una forma inusuale di risposta immunitaria innata contro organismi non microbici potenzialmente letali.

RIEPILOGO

- * L'ipersensibilità immediata è una reazione immunitaria innescata dal legame dell'antigene alle IgE associate alla superficie dei mastociti. Tale processo porta al rilascio di mediatori dell'infiammazione.
- * La sequenza degli eventi dell'ipersensibilità immediata comprende: l'esposizione a un antigene (allergene) che stimola la risposta T_H2 e la produzione di IgE; il legame delle IgE al recettore FcεRI dei mastociti; l'aggregazione delle IgE e di FcεRI; l'attivazione dei mastociti con rilascio di mediatori proinfiammatori.
- * Gli individui suscettibili all'ipersensibilità immediata sono definiti atopici e, rispetto ai soggetti non atopici, presentano generalmente livelli maggiori di IgE circolanti e una densità maggiore di recettori per Fc IgE-specifici sui mastociti. La sintesi di IgE è indotta sia dall'esposizione all'antigene sia dalla stimolazione indotta dall'IL-4 secreta da linfociti T_{FH}.
- * I mastociti derivano da precursori midollari e maturano nei tessuti. Essi esprimono il recettore ad alta affinità per le IgE (FcεRI) e contengono granuli citoplasmatici nei quali sono immagazzinati vari mediatori proinfiammatori. Le sottopopolazioni di mastociti (mucosale e connettivale) producono diversi tipi di mediatori. I basofili sono granulociti circolanti che esprimono il recettore FcεRI ad alta affinità e che contengono granuli con un contenuto simile a quello dei mastociti.

- * Gli eosinofili sono un tipo particolare di granulociti che vengono reclutati nelle reazioni infiammatorie dall'IL-4 e dalle chemochine e attivati dall'IL-5. Gli eosinofili sono cellule effettrici coinvolte nell'eliminazione dei parassiti, mentre nelle reazioni allergiche essi contribuiscono al danno tissutale.
- * In seguito al legame dell'antigene alle IgE presenti sulla superficie dei mastociti e dei basofili, i recettori ad alta affinità FcεRI vanno incontro ad aggregazione, attivando secondi messaggeri intracellulari che inducono il rilascio del contenuto dei granuli e la neosintesi di altri mediatori. I mastociti e i basofili attivati producono e rilasciano tre importanti classi di mediatori: le amine biogene (come l'istamina), i mediatori lipidici (come le prostaglandine, i leucotrieni e il PAF) e le citochine (come il TNF, l'IL-4, l'IL-13 e l'IL-5).
- * Le amine biogene e i mediatori lipidici provocano quelle reazioni vascolari e muscolari rapide che caratterizzano l'ipersensibilità immediata, come la vasodilatazione, l'aumento della permeabilità vascolare, la broncocostrizione e l'aumento della peristalsi intestinale. Le citochine rilasciate dai mastociti e dai linfociti T_H2 mediano invece la reazione tardiva, che consiste in una reazione infiammatoria caratterizzata dal reclutamento di neutrofili ed eosinofili.
- * La suscettibilità alle malattie allergiche è ereditaria ed è stata dimostrata l'associazione di diverse variazioni alleliche all'asma allergica. Per causare atopia, la suscettibilità genetica deve comunque associarsi a fattori ambientali.
- * I diversi organi mostrano forme di ipersensibilità immediata che coinvolgono mediatori e cellule bersaglio differenti. La forma più grave consiste in una reazione sistemica definita shock anafilattico. L'asma è una forma di ipersensibilità immediata che si associa a una reazione di fase tardiva che si manifesta a livello polmonare. La rinite allergica (febbre da fieno) è la più comune patologia a base allergica delle vie aeree superiori. Gli allergeni alimentari possono provocare diarrea e vomito. A livello cutaneo, l'ipersensibilità immediata si manifesta come reazione pomfoide e come reazione tardiva che può indurre eczema cronico.
- * La terapia farmacologica delle ipersensibilità mira a inibire la produzione di mediatori da parte dei mastociti e al blocco dei loro effetti sugli organi bersaglio. L'immunoterapia mira a prevenire o

ridurre le risposte T_H2 verso allergeni specifici e a inibire la produzione di IgE.

- * Le reazioni di ipersensibilità immediata proteggono contro le infezioni elmintiche promuovendo la peristalsi intestinale e la citotossicità cellulo-mediata dipendente da anticorpi innescata dalle IgE e dagli eosinofili. Inoltre, i mastociti possono anche svolgere un importante ruolo nelle risposte immunitarie innate verso le infezioni batteriche.

LETTURE CONSIGLIATE

IgE e linfociti T_H2

Wu L.C.; Zarrin A.A: The production and regulation of IgE by the immune system. *Nature Reviews Immunology* 14:247–260, (2014).

Mastociti ed eosinofili

Abraham S.N: St John AL: Mast cell–orchestrated immunity to pathogens. *Nature Reviews Immunology* 10:440–452 (2010).

Galli S.J.; Tsai M: IgE and mast cells in allergic disease. *Nature Medicine* 18:693–704, (2012).

Gilfillan A.M.; Tkaczyk C: Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nature Reviews Immunology* 6:218–230, (2006).

Gurish M.F.; Austen K.F: Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. *Immunity* 37:25–33, (2012).

Kalesnikoff J.; Galli S.J: New developments in mast cell biology. *Nature Immunology* 9:1215–1223, (2008).

Rivera J.; Fierro N.A.; Olivera A.; Suzuki R: New insights on mast cell activation via the high affinity receptor for IgE. *Advances in Immunology* 98:85–120, (2008).

Rothenberg M.E.; Hogan S.P: The eosinophil. *Annual Review of Immunology* 24:147–174, (2006).

Stone K.D.; Prussin C.; Metcalfe D.D: IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125:S73–S80, (2010). Allergic Diseases

Allergie

Bossé Y: Genome-wide expression quantitative trait loci analysis in asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 3:443–452, (2013).

Bufford J.D.; Gern J.E: The hygiene hypothesis revisited. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 25:247–262, v-vi, (2005).

Galli S.J.; Tsai M.; Piliponsky A.M: The development of allergic inflammation. *Nature* 454:445–454, (2008).

Gould H.J.; Sutton B.J: IgE in allergy and asthma today. *Nature Reviews Immunology* 8:205–217, (2008).

Holgate S.T: Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nature Medicine* 18:673–683, (2012).

Holloway J.W.; Yang I.A.; Holgate S.T: Genetics of allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125:S81–S94, (2010).

Kauffmann F.; Demenais F: Gene-environment interactions in asthma and allergic diseases: challenges and perspectives. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 130:1229–1240, (2012).

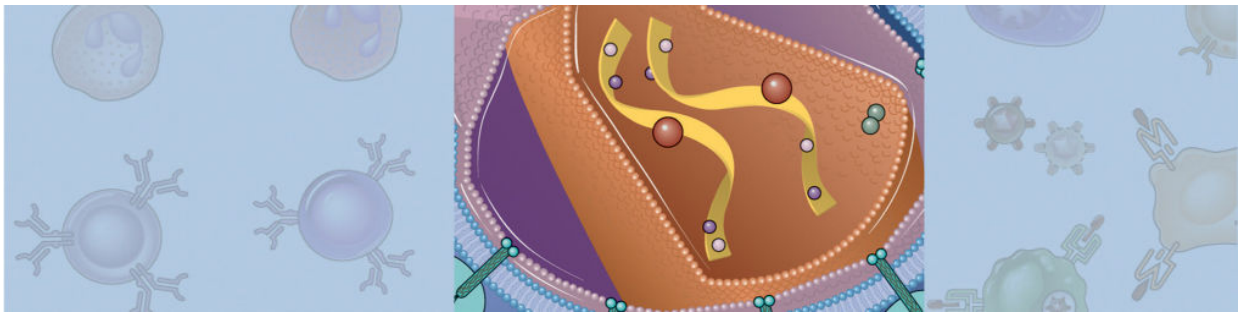
Kim H.Y.; DeKruyff R.H.; Umetsu D.T: The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nature Immunology* 11:577–584, (2010).

Lambrecht B.N.; Hammad H: Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity* 31:412–424, (2009).

Licona-Limon P.; Kim L.K.; Flavell R.A: T_H2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nature Immunology* 14:536–542, (2013).

CAPITOLO

21



Immunodeficienze congenite e acquisite

CARATTERISTICHE GENERALI DELLE IMMUNODEFICIENZE

IMMUNODEFICIENZE CONGENITE (PRIMARIE)

- Deficit dell'immunità innata
- Immunodeficienze combinate gravi
- Deficit anticorpali: difetti di maturazione e attivazione dei linfociti B
- Deficit di attivazione e funzionalità dei linfociti T
- Malattie multisistemiche associate a immunodeficienza
- Approcci terapeutici alle immunodeficienze congenite

IMMUNODEFICIENZE ACQUISITE (SECONDARIE)

VIRUS DELL'IMMUNODEFICIENZA UMANA E SINDROME DELL'IMMUNODEFICIENZA ACQUISITA

- Caratteristiche molecolari e biologiche dell'HIV
- Patogenesi dell'infezione da HIV e dell'AIDS
- Quadro clinico dell'AIDS
- Risposta immunitaria all'HIV
- Meccanismi di elusione immunitaria da parte dell'HIV
- "Elite controllers" e "long-term non progressors": un possibile ruolo dei geni dell'ospite
- Terapia e prevenzione dell'AIDS e prospettive di vaccinazione

RIEPILOGO

L'integrità del sistema immunitario è essenziale per la difesa contro i microrganismi patogeni e le tossine da essi prodotte e quindi per la sopravvivenza stessa dell'individuo. Deficit a carico di una o più componenti del sistema immunitario possono condurre a malattie gravi e spesso fatali definite **malattie da immunodeficienza**. Tali malattie sono raggruppate in due categorie, la prima delle quali è quella delle **immunodeficienze primarie** o **congenite**, causate da difetti genetici che si manifestano come accresciuta suscettibilità alle infezioni. Generalmente esse tendono a manifestarsi precocemente nel neonato o nell'infanzia, ma possono occasionalmente anche esordire in età più avanzata. Si stima che negli Stati Uniti circa 1 individuo su 500 nasca con un'alterazione a carico di una delle componenti del sistema immunitario, ma solo una piccola percentuale di questi risulti colpita in maniera talmente grave da manifestare clinicamente la malattia. La seconda categoria è quella delle

immunodeficienze secondarie o **acquisite**, che si sviluppano a seguito di situazioni pregresse quali malnutrizione, neoplasie disseminate, trattamenti con farmaci ad azione immunosoppressiva o infezioni a carico delle cellule del sistema immunitario. Rilevante a questo riguardo è il virus dell'immunodeficienza umana (*Human Immunodeficiency Virus*, HIV), l'agente eziologico della sindrome da immunodeficienza acquisita (*Acquired ImmunoDeficiency Syndrome*, AIDS). In questo capitolo descriveremo le principali immunodeficienze congenite e acquisite, con particolare attenzione alla loro patogenesi e alle componenti del sistema immunitario coinvolti.

CARATTERISTICHE GENERALI DELLE IMMUNODEFICIENZE

Prima di descrivere singolarmente le singole immunodeficienze, è importante sottolineare alcune delle loro caratteristiche generali.

- ***La principale conseguenza delle immunodeficienze è un'aumentata suscettibilità alle infezioni.*** La natura delle infezioni dipende in gran parte dalla componente del sistema immunitario interessata dal deficit (Tab. 21-1). Un deficit dell'immunità umorale si associa solitamente ad aumentata suscettibilità alle infezioni causate da batteri capsulati, germi piogeni e da alcuni virus, mentre i deficit dell'immunità cellulare si accompagnano a infezioni virali o di altri microrganismi intracellulari. Infine, i deficit combinati dell'immunità umorale e cellulare si traducono nell'aumento della suscettibilità a entrambi i tipi di infezione. I pazienti con immunodeficienza primitiva, in modo particolare quelli con deficit dell'immunità cellulare, spesso si presentano con infezioni microbiche che sono generalmente affrontate senza conseguenze dagli individui sani; tali infezioni vengono definite come opportunistiche. I deficit dell'immunità innata possono dare luogo a diverse categorie di infezioni microbiche, a seconda della via o del tipo cellulare interessato. I deficit del complemento, per esempio, ricordano i deficit anticorporali per la loro presentazione clinica, mentre i deficit delle cellule NK

determinano principalmente infezioni virali ricorrenti. Una mole crescente di dati suggerisce che i soggetti adulti affetti da infezioni gravi o ricorrenti presentino mutazioni a carico di geni che regolano la risposta immunitaria. La disponibilità di nuove tecnologie per un rapido ed efficiente sequenziamento del DNA ha aumentato esponenzialmente la capacità di identificare specifici loci genetici che, se mutati, conferiscono suscettibilità ai patogeni.

- ***Le immunodeficienze predispongono anche all'insorgenza di alcuni tipi di neoplasie***. Molti dei tumori che si accompagnano alle immunodeficienze sono dovuti all'effetto di virus oncogeni, come il virus di Epstein-Barr (EBV) e il virus del papilloma umano. L'aumentata incidenza delle neoplasie si accompagna più frequentemente a deficit dei linfociti T poiché, come è stato descritto nel Capitolo 18, queste cellule svolgono un ruolo determinante nella sorveglianza immunitaria verso i tumori maligni.
- ***Paradossalmente, alcune forme di immunodeficienza si associano a un aumento delle manifestazioni autoimmunitarie***. Le ragioni di questa associazione non sono completamente chiare.
- ***Le immunodeficienze possono essere causate da difetti a carico della maturazione o dell'attivazione dei linfociti o a carico dei meccanismi effettori dell'immunità innata e specifica***. Le malattie da immunodeficienza sono estremamente eterogenee sia dal punto di vista clinico sia da quello anatomopatologico. Almeno in parte, ciò è dovuto al fatto che le diverse malattie possono coinvolgere differenti componenti del sistema immunitario.

TABELLA 21-1 Caratteristiche delle immunodeficienze che colpiscono i linfociti T o B

Caratteristica	Deficit a carico dei linfociti B	Deficit a carico dei linfociti T
Suscettibilità alle infezioni	Batteri piogeni (otite, polmonite, meningite, osteomielite), batteri e virus enterici, alcuni parassiti	*Pneumocystis jiroveci*, molti virus, micobatteri atipici e altri batteri intracellulari, miceti
Diagnosi		
Livelli di Ig nel siero	Ridotti	Normali o ridotti
Reazioni DTH ai comuni antigeni	Normali	Ridotte

Morfologia dei tessuti linfoidi	Follicoli e centri germinativi assenti o ridotti (aree B)	Follicoli solitamente normali, possibile riduzione delle aree paracorticali (aree T)
DTH *(Delayed-Type Hypersensivity)*, ipersensibilità ritardata.		

In questo capitolo descriveremo per prime le immunodeficienze congenite a carico del compartimento umorale e cellulare dell'immunità specifica. Concluderemo quindi con una descrizione delle immunodeficienze acquisite, con particolare riferimento all'AIDS.

IMMUNODEFICIENZE CONGENITE (PRIMARIE)

Le alterazioni primitive che causano le immunodeficienze congenite possono essere riscontrate a carico dell'immunità innata, a livello della maturazione o della risposta dei linfociti. Le alterazioni ereditarie dell'immunità innata spesso coinvolgono l'attivazione del complemento o il processo di fagocitosi. Le alterazioni a carico dello sviluppo dei linfociti possono essere causate da mutazioni a livello dei geni codificanti enzimi, proteine adattatrici, proteine di trasporto e fattori di trascrizione. Lo studio nel topo di questi difetti ereditari (e delle conseguenti funzionalità compromesse) è stato utile per comprendere il processo fisiologico di sviluppo e la funzione dei linfociti (vedi Cap. 8). Le alterazioni a carico dello sviluppo o della funzione dei linfociti B causano deficit della produzione di anticorpi, con conseguente aumento della suscettibilità alle infezioni da patogeni extracellulari e, in particolare, da batteri capsulati. In effetti, la diagnosi di immunodeficienze a carico dei linfociti B viene effettuata sulla base dei ridotti livelli di immunoglobuline sieriche e di una ridotta risposta anticorpale alle vaccinazioni. In alcuni casi, si può anche riscontrare un numero ridotto di linfociti B, in circolo o nei tessuti linfoidi e/o l'assenza di plasmacellule tissutali (vedi Tab. 21-1). Le alterazioni a carico della maturazione e della funzione dei linfociti T causano invece deficit dell'immunità cellulo-mediata, nonché una ridotta produzione di anticorpi di tipo T-dipendente. Un deficit di linfociti T helper può inoltre

contribuire al difetto di produzione anticorpale. La diagnosi delle immunodeficienze primarie dei linfociti T è in prima analisi effettuata tramite: il riscontro della diminuzione del numero di linfociti T nel sangue periferico; una risposta proliferativa debole agli attivatori policlonali (come la fitoemagglutinina); una diminuita o assente risposta da ipersensibilità ritardata cutanea (*Delayed-Type Hypersensitivity*, DTH) ad antigeni microbici ubiquitari (come *Candida*). I difetti a carico sia dell'immunità umorale sia di quella cellulo-mediata sono classificati come immunodeficienze severe combinate. Nei paragrafi seguenti descriveremo le immunodeficienze causate da mutazioni a carico dei geni codificanti per componenti dell'immunità innata o dei geni necessari allo sviluppo e all'attivazione dei linfociti. Infine, descriveremo brevemente gli approcci terapeutici a tali patologie.

Deficit dell'immunità innata

L'immunità innata costituisce la prima linea di difesa nei confronti degli agenti patogeni infettivi. Due suoi importanti meccanismi effettori sono i fagociti e il complemento, che peraltro contribuiscono sostanzialmente anche alle fasi effettrici dell'immunità specifica. Ne consegue che i deficit congeniti a carico dei fagociti o del complemento si esprimono attraverso infezioni ricorrenti di varia gravità. I deficit del sistema del complemento sono descritti nel Capitolo 13.

In questa parte del capitolo vengono descritti alcuni esempi di disordini congeniti dei fagociti (Tab. 21-2) e i difetti congeniti dell'asse dei recettori Toll-like (*Toll-Like Receptors*, TLR) e della via interleuchina-12/interferone-γ (IL-12/IFN-γ). I difetti a carico delle cellule fagocitiche generalmente causano infezioni cutanee e respiratorie dovute a batteri o funghi; tra questi ultimi prevalgono *Aspergillus* e *Candida*. In questi pazienti è anche frequente l'insorgenza di ascessi profondi e di stomatiti. I difetti a carico della trasduzione del segnale dei TLR e dell'IFN di tipo I possono contribuire al rischio di infezioni batteriche ricorrenti da germi piogeni come anche a infezioni virali invasive; i difetti nelle vie di trasduzione dell'IL-12 e dell'IFN-γ aumentano la suscettibilità ai patogeni intracellulari e in modo particolare alle infezioni micobatteriche.

TABELLA 21-2 Deficit congeniti dell'immunità innata

Malattia	Deficit funzionali	Basi molecolari del deficit
Malattia granulomatosa cronica	Ridotta produzione delle specie reattive tossiche dell'ossigeno da parte dei fagociti; infezioni ricorrenti da batteri intracellulari e da funghi	Mutazioni a carico dei geni che codificano per le proteine del complesso dell'ossidasi dei fagociti; phox-91 (subunità α del citocromo b_{588}) è mutata nella forma della malattia legata al cromosoma X
LAD-1 (*Leukocyte Adhesion Deficiency type 1*)	Deficit di adesione dei leucociti alle cellule endoteliali e di migrazione nei tessuti causata da una ridotta o assente espressione delle integrine β_2; ricorrenti infezioni batteriche e micotiche	Mutazioni a carico del gene che codifica per la catena β (CD18) delle integrine β_2
LAD-2 (*Leukocyte Adhesion Deficiency type 2*)	Ridotto "rolling" e migrazione nei tessuti dei leucociti causata da una ridotta o assente espressione dei ligandi leucocitari per le E- e le P-selectine dell'endotelio; conseguente incapacità dei leucociti di migrare nei tessuti; ricorrenti infezioni batteriche e micotiche	Mutazioni a carico del gene che codifica per il trasportatore-1 del GDP-fucosio necessario per il trasporto del fucosio all'interno del Golgi e per la sua incorporazione nel sialil-Lewis X
LAD-3 (*Leukocyte Adhesion Deficiency type 3*)	Ridotto "rolling" e migrazione nei tessuti dei leucociti causata da un difetto di trasduzione del segnale "inside out" e conseguente difetto di attivazione delle integrine indotto dalle chemochine.	Mutazione del gene che codifica per la proteina KINDLIN-3, una proteina citoscheletrica correlata alla traduzione "inside out"
Sindrome di Chédiak-Higashi	Ridotta fusione dei vacuoli e ridotta funzione lisosomiale nei neutrofili, nei macrofagi, nelle cellule dendritiche, nelle cellule NK, nei linfociti T citotossici e in vari altri tipi cellulari; ricorrenti infezioni da batteri piogeni	Mutazione a carico del gene che codifica per la proteina LYST e che porta a difetti nella secrezione dei granuli e nella funzione lisosomiale
Deficit di cellule NK	Cellule NK ridotte o assenti	Mutazioni del gene codificante per il fattore di trascrizione GATA-2 e del gene condificante

		per la DNA elicasi MCM-4
Deficit nella trasduzione del segnale da parte dei TLR	Ricorrenti infezioni causate dal deficit nella trasduzione del segnale da parte dei TLR e di CD40 e ridotta produzione di interferone di tipo I	Mutazioni a carico dei geni che codificano per *NEMO*, *UNC93B*, *MyD88*, *IκBα* e *IRAK-4* che compromettono l'attivazione di NF-κB a valle dei TLR
Suscettibilità mendeliana alle malattie micobatteriche	Malattia grave causata da micobatteri ambientali non tubercolari e da BCG	Mutazioni a carico di *IL-12p40*, *IL-12RB*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1*, *NEMO* e *ISG15*
BCG (*Bacillus Calmette-Guérin)*, bacillo di Calmette-Guérin; IRAK-4 (*IL-1 Receptor-Associated Kinase 4)* chinasi associata al recettore IL-1; LYST, *LYSosomal Trafficking protein;* NEMO (*NF-κB Essential MOdulator*) modulatore essenziale di NF-κB.		

Deficit dell'attività microbicida dei fagociti: malattia granulomatosa cronica

La malattia granulomatosa cronica (**Chronic Granulomatous Disease, *CGD) è causata da mutazioni a carico dei geni che codificano per le componenti del complesso enzimatico dell'ossidasi (phox) dei fagociti***. È una malattia genetica molto rara (l'incidenza stimata negli Stati Uniti è attorno a 1 individuo su 1 milione). Circa due terzi dei casi di CGD mostrano un meccanismo di trasmissione legato al cromosoma X, mentre le restanti forme sono autosomiche recessive. La forma più comune di malattia legata al cromosoma X è causata da una mutazione del gene che codifica per la subunità α di 91 kD del citocromo b_{558}, una proteina di membrana conosciuta come phox-91. Questa mutazione causa un deficit della produzione dell'anione superossido, una specie reattiva dell'ossigeno che rappresenta uno dei principali meccanismi microbicidi dei fagociti, in modo particolare dei neutrofili (vedi Cap. 4). Le mutazioni nei geni che codificano per altri componenti dell'ossidasi fagocitica sono implicate in altre forme autosomiche recessive della CGD. La diminuita produzione di specie reattive dell'ossigeno si traduce nell'incapacità di eliminare i microrganismi fagocitati.

La CGD è caratterizzata da infezioni di miceti e batteri intracellulari, quali lo *Staphylococcus*, in genere presenti già dalla prima infanzia. La

principale causa di morte è l'infezione invasiva del fungo *Aspergillus*. Come già accennato, i microrganismi più pericolosi per i pazienti affetti da CGD sono quelli in grado di produrre la catalasi, un enzima che neutralizza il perossido d'idrogeno, una sostanza battericida che viene prodotta dalle cellule dell'ospite a partire dal superossido, un radicale reattivo dell'ossigeno. Dal momento che gli agenti infettivi responsabili delle infezioni non vengono adeguatamente debellati, essi stimolano risposte T cellulo-mediate croniche che, a loro volta, stimolano l'attivazione dei macrofagi e la formazione di granulomi. È verosimile che i macrofagi attivati cerchino di eliminare i microbi nonostante il difetto di produzione di specie reattive dell'ossigeno. Questa caratteristica istologica è responsabile del nome dato a questa malattia. La malattia è frequentemente fatale anche quando adeguatamente trattata con terapie antibiotiche aggressive.

L'IFN-γ stimola la trascrizione del gene che codifica per la phox-91 e induce anche altri componenti del complesso enzimatico dell'ossidasi fagocitica. Quindi, l'IFN-γ può stimolare la produzione del superossido da parte dei neutrofili nei pazienti affetti da CGD, particolarmente in quei casi in cui il gene phox-91 è strutturalmente intatto ed è solo la sua trascrizione a essere diminuita. Il ripristino della produzione di superossido (anche solo del 10% rispetto ai valori normali) che si ottiene attraverso il trattamento con l'IFN-γ è sufficiente ad assicurare un grado accettabile di resistenza alle infezioni ed è per questo attualmente utilizzato per il trattamento della CGD.

Deficit di adesione leucocitaria

I deficit di adesione leucocitaria costituiscono un gruppo di malattie a trasmissione autosomica recessiva causate da difetti a carico di molecole di adesione leucocitarie ed endoteliali. Queste malattie sono caratterizzate dall'incapacità dei leucociti, in particolare dei neutrofili, di migrare ai siti di infezione, determinando così lo sviluppo di gravi periodontiti e di altre gravi infezioni che insorgono nell'infanzia, oltre a un grave difetto nella formazione del pus. I deficit di adesione leucocitaria sono causati da distinti difetti genetici.

- ***Il deficit di adesione leucocitaria di tipo 1 (*** **Leukocyte Adhesion Deficiency,** ***LAD-1)*** è una malattia rara a trasmissione autosomica

recessiva caratterizzata da ricorrenti infezioni batteriche e fungine accompagnate dall'incapacità di cicatrizzare le ferite. Nei pazienti affetti da LAD-1 la maggior parte delle funzioni leucocitarie che dipendono dalle molecole di adesione risulta difettiva: tra queste, l'adesione all'endotelio, l'aggregazione, la chemotassi, la fagocitosi e l'attività citotossica dei neutrofili, delle cellule NK e dei linfociti T. Le basi molecolari di questa malattia consistono in unaridotta espressione delle integrine β_2 (eterodimeri della famiglia delle glicoproteine CD11 e CD18), dovuta a varie mutazioni che avvengono principalmente a carico del gene che codifica per CD18. Ricordiamo che le integrine β_2 comprendono le molecole LFA-1 (*Leukocyte Function-associated Antigen-1* o CD11aCD18), Mac-1 (CD11bCD18) e p150,95 (CD11cCD18). Queste proteine partecipano all'interazione tra i linfociti T e le cellule che presentano l'antigene (*Antigen Presenting Cells*, APC) e ai processi di adesione dei leucociti ad altre APC (soprattutto cellule endoteliali) (vedi Cap. 3).

- ***Il deficit di adesione leucocitaria di tipo 2*** è un ulteriore esempio di rara malattia ereditaria clinicamente simile al LAD-1, che però non coinvolge un deficit delle integrine. Il LAD-2 è causato dall'assenza di sialil-Lewis X, un tetrasaccaride espresso dai neutrofili e da altri leucociti che agisce da ligando per la E- e la P-selectina, molecole espresse dall'endotelio attivato (vedi Cap. 3). Questo difetto è causato da una mutazione del gene che codifica per il trasportatore del GDP-fucosio, che è responsabile del trasporto del fucosio nel complesso di Golgi, determinando un difetto di sintesi di sialil-Lewis X. L'assenza di sialil-Lewis X causa un difetto del legame dei leucociti all'endotelio, l'assenza del processo di rolling leucocitario e quindi una ridotta capacità di reclutare i leucociti nel sito infiammatorio. Il difetto di fucosilazione che si osserva nel LAD-2 contribuisce a causare ritardo mentale e alcuni difetti di sviluppo e a determinare il fenotipo ematico Bombay, ovvero la mancanza di antigeni per i gruppi sanguigni A o B a causa dell'assenza del glicano fucosilato precursore della molecola H.
- ***Il deficit di adesione leucocitaria di tipo 3 (LAD-3)*** consiste in un difetto di trasduzione del segnale "inside-out" (dall'interno della cellula verso l'esterno) responsabile dell'attivazione delle integrine in seguito all'attivazione da parte delle chemochine; tale meccanismo è necessario

affinché i leucociti possano legare l'endotelio (vedi Cap. 3). Questa condizione è dovuta, almeno in una parte dei pazienti affetti, a mutazioni nel gene che codifica per la proteina KINDLIN-3 che lega la coda citoplasmatica di alcune integrine e che è coinvolta nella loro trasduzione del segnale. A causa del difetto di funzionamento delle integrine espresse dalle piastrine, alcuni pazienti con mutazioni di KINDLIN-3 presentano un aumentato rischio di sanguinamento.

Deficit delle cellule NK e dei fagociti

In un numero limitato di pazienti è stato identificato un deficit delle cellule NK dovuto a mutazioni autosomiche dominanti nel gene codificante per il fattore di trascrizione GATA-2. La mancata attività di GATA-2 determina: 1) ridotto numero di precursori a livello del midollo osseo e conseguente deficit di cellule NK, 2) minor numero di monociti, cellule dendritiche e linfociti B. Le mutazioni autosomiche recessive a carico del componente del complesso di mantenimento del minicromosoma 4 (MCM4), un enzima elicasi del DNA, determinano inoltre un deficit di cellule NK a cui si associa insufficienza surrenalica e ritardo della crescita. Le mutazioni autosomiche recessive a carico di CD16 (FcγRIIIA), il recettore Fc responsabile dell'ADCC, determina la perdita della funzione delle cellule NK, che va oltre allo specifico difetto di attività di ADCC. Il motivo per cui CD16 è fondamentale per il funzionamento delle cellule NK non è chiaro. I pazienti presentano infezioni virali gravi, principalmente a causa di virus appartenenti alle famiglie dell'herpesvirus e del papillomavirus.

La sindrome di Chédiak-Higashi è una rara malattia autosomica recessiva caratterizzata da ricorrenti infezioni da parte di batteri piogeni, parziale albinismo oculocutaneo e infiltrazione di linfociti non neoplastici in vari organi. I neutrofili, i monociti e i linfociti dei pazienti affetti da questa patologia contengono lisosomi giganti. La sindrome di Chédiak-Higashi è causata da mutazioni a carico del gene che codifica per la proteina LYST che regola il movimento intracellulare dei lisosomi. Le mutazioni causano diversi difetti: 1) una ridotta capacità di fusione tra fagosomi e lisosomi nei neutrofili e nei macrofagi (responsabile della ridotta resistenza alle infezioni); 2) una ridotta formazione di melanosomi nei melanociti (responsabile dell'albinismo); 3) anomalie dei fagosomi nelle cellule del

sistema nervoso (responsabili dei deficit nervosi) e nelle piastrine (responsabili dei disordini coagulativi). I lisosomi giganti si formano nei neutrofili durante la maturazione di queste cellule a partire dai precursori mieloidi midollari. Ciò causa una morte prematura di queste cellule che si traduce in una modesta leucopenia. I neutrofili che riescono a sopravvivere contengono comunque una ridotta quantità degli enzimi lisosomiali necessari a una normale attività microbicida. Queste cellule presentano anche deficit della chemotassi e della fagocitosi, il che contribuisce ad abbassare ulteriormente il loro potenziale microbicida. Infine, nei pazienti affetti dalla sindrome di Chédiak-Higashi, anche la funzione delle cellule NK è compromessa, probabilmente a causa di anomalie nei granuli citoplasmatici che normalmente contengono le proteine ad azione citotossica. Il difetto dell'attività citotossica dei linfociti T citotossici (*Cytotoxic T Lynphocytes*, CTL) si osserva solo sporadicamente e con gravità variabile nei diversi pazienti. Un ceppo di topi, definiti topi beige, costituisce il modello animale della sindrome di Chédiak-Higashi. Questi animali sono caratterizzati da un deficit funzionale delle cellule NK e dalla presenza di lisosomi giganti nei leucociti. Il gene mutato che determina questo fenotipo è stato mappato nel locus murino della proteina, *LYST*.

Deficit ereditari della trasduzione del segnale dei TLR, di NF- κB e dagli interferoni di tipo I

I difetti di tipo ereditario della risposta biologica ai TLR sono piuttosto rari e sono stati identificati solo recentemente. I deficit di trasduzione del segnale dei TLR causano fenotipi clinici piuttosto circoscritti. La via di trasduzione principale della maggior parte dei TLR, e anche del recettore dell'interleuchina-1 (IL-1R), coinvolge la molecola adattatrice MyD88 e le chinasi IRAK-4 e IRAK-1 (vedi Cap. 4). Questa via attiva la trascrizione di citochine proinfiammatorie attraverso la via del fattore nucleare κB (*Nuclear Factor-κB*, NF-κB). Gli individui che presentano mutazioni a carico di MyD88 e IRAK-4 soffrono di gravi infezioni batteriche invasive nei primi anni di vita, in modo particolare polmonite pneumococcica. In età adulta, la gravità delle infezioni tende a ridursi. La trasduzione del segnale di TLR3 utilizza TRIF, una proteina adattatrice, al posto di MyD88, e TBK1, una proteina con attività di serina/treonina chinasi che funziona a valle di TRIF

al fine di attivare sia IRF3 sia NF-κB attraverso una via non canonica. Le mutazioni autosomiche recessive di TRIF e le mutazioni autosomiche dominanti nella TRAF3 E3 ligasi determinano la suscettibilità per l'encefalite da herpes simplex. Un fenotipo simile si osserva in caso di mutazioni autosomiche dominanti a carico del gene che codifica per TBK1. I TLR 3, 7, 8 e 9 riconoscono gli acidi nucleici, sono localizzati nel compartimento endosomiale e richiedono per il loro funzionamento la proteina UNC93B (*Uncoordinated 93B*), presente sulla membrana del reticolo endoplasmatico, la quale interagisce con i TLR endosomiali durante la loro sintesi, favorendone il passaggio agli endosomi. La proteina UNC93B è anche necessaria per la trasduzione del segnale di alcuni TLR specifici per gli acidi nucleici. Mutazioni in eterozigosi di *TLR3* come anche mutazioni omozigoti di UNC93B determinano una ridotta produzione di IFN di tipo I e aumentano inoltre il rischio di encefaliti da herpes simplex. L'attivazione delle vie di trasduzione del segnale a valle dei TLR endosomiali determina la sintesi e la secrezione degli interferoni di tipo I; questi ultimi sono in grado, attraverso i recettori specifici, di attivare il fattore di trascrizione STAT1. In alcuni pazienti, le mutazioni che determinano la perdita della funzione di STAT1 sono correlatea infezioni virali invasive, tra le quali anche l'encefalite da herpes simplex.

Alcune immunodeficienze umane sono causate proprio da difetti nei meccanismi di trasduzione del segnale a valle dei TLR che influiscono in maniera specifica sull'attivazione di NF-κβ. Mutazioni puntiformi a carico del gene che codifica per IKKγ (*Inhibitor of κB Kinase* γ), anche conosciuto con l'acronimo NEMO (*Nuclear factor κB Essential MOdulator*), un componente del complesso della chinasi IκB, che è necessario per l'attivazione dell'NF-κB, contribuiscono a una patologia recessiva legata al cromosoma Xconosciuta come displasia anidrotica ectodermica associata a immunodeficienza (*Anhidrotic Ectodermal Dysplasia with ImmunoDeficienza*, EDA-ID). In questa condizione la differenziazione delle strutture di origine ectodermica viene compromessa e la funzione immune risulta deficitaria attraverso diversi meccanismi. Ne consegue che le risposte innescate dai TLR, così come da CD40, sono deficitarie. I pazienti portatori di questi deficit mostrano aumentata suscettibilità alle infezioni da batteri capsulati intracellulari (come i micobatteri), da virus e da germi come *Pneumocystis jiroveci* (vedi anche, più avanti, la discussione relativa alle

sindromi con Iper-IgM). È stata descritta una forma autosomica recessiva di EDA-ID in cui una mutazione puntiforme ipermorfica del gene che codifica per l'IκBα ne previene la fosforilazione, l'ubiquitinazione e la degradazione, compromettendo quindi la corretta attivazione di NF-κB.

Difetti nell'asse IL-12/IFN-γ

L'IL-12, che è prodotta dalle cellule dendritiche e dai macrofagi, stimola la sintesi dell'IFN-γ da parte dei linfociti T helper, dei CTL e delle cellule NK (vedi Cap. 4). Mutazioni a carico dei geni che codificano per l'IL-12p40, per la catena β1 del recettore per l'IL-12, per entrambe le catene del recettore per l'IFN-γ, come anche mutazioni di *STAT1* e IKKγ/NEMO, danno luogo a suscettibilità ai micobatteri ambientali (spesso noti come micobatteri atipici), tra cui *Micobacterium avium*, *Micobaterium kansasii* e *Micobacterium fortuitum*. L'espressione "suscettibilità mendeliana" per la malattia micobatterica (*Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease*, MSMD) indica quei disturbi in cui il soggetto è predisposto a gravi infezioni di micobatteri scarsamente virulenti, quali i micobatteri ambientali non tubercolari e il BCG (bacillo di Calmette-Guérin).Anche le mutazioni autosomiche recessive a carico del gene *ISG15* (*Interferon Stimulated Gene 15*, ISG15) causano MSMD. L'interferone induce *ISG15*, una proteina rilasciata dai fagociti, tra cui i neutrofili, che induce altre cellule, principalmente le cellule NK, a secernere IFN-γ. È stato inoltre dimostrato che ISG15 opera a livello intracellulare per modificare le proteine con modalità analoghe all'ubiquitina; sembrerebbe, tuttavia, che per la protezione contro le infezioni micobatteriche sia necessaria la forma secreta di questa proteina.

Difetti nello sviluppo della milza

Lo sviluppo della milza può essere alterato in una condizione a trasmissione autosomica dominante (e talvolta sporadica) denominata Asplenia Congenita Isolata. Questi pazienti presentano mutazioni in eterozigosi di tipo missenso a carico di NBX2.5, gene che codifica per una proteina coinvolta nella regolazione trascrizionale dello sviluppo splenico. L'asplenia può inoltre essere causata da mutazioni dei geni che controllano la lateralità sinistra-destra, che ha effetto anche su altri organi. I pazienti con asplenia congenita

soffrono di infezioni gravi di batteri capsulati, in modo particolare da *Streptococcus pneumonia*.

Immunodeficienze combinate gravi

Le immunodeficienze che coinvolgono sia l'immunità umorale sia quella cellulo-mediata sono chiamate immunodeficienze combinate gravi (* Severe Combined Immunodeficiencies, *SCID) (Tabella 21-3). La SCID è causata da un difetto di differenziazione deilinfociti T, che a volte si può associare a un difetto di maturazione dei linfociti B (Fig. 21-1).

Quando lo sviluppo dei linfociti B non è compromesso, il difetto dell'immunità umorale è dato dall'assenza della funzione helper dei linfociti T.

TABELLA 21-3 Immunodeficienze combinate gravi

Malattia	Deficit funzionali	Basi molecolari del deficit
Deficit nella trasduzione del segnale da parte delle citochine		
SCID legata al cromosoma X	Linfociti T marcatamente diminuiti; linfociti B normali o aumentati; Ig sieriche diminuite	Mutazioni a carico del gene che codifica per la catena γ comune del recettore per le citochine; difetti nello sviluppo dei linfociti T in assenza di stimolazione da parte dell'IL-7
Forme autosomiche recessive	Linfociti T marcatamente diminuiti; linfociti B normali o aumentati; Ig sieriche diminuite	Mutazioni nei geni *IL-2RA, IL-7RA, JAK3*
Deficit del catabolismo dei nucleotidi		
Deficit di ADA	Progressiva diminuzione dei linfociti T e B e delle cellule NK; Ig sieriche diminuite	Mutazioni nel gene ADA che determinano l'accumulo di metaboliti tossici nei linfociti
Deficit di PNP	Progressiva diminuzione dei linfociti T e B e delle cellule NK; Ig sieriche diminuite	Mutazioni nel gene PNP che portano all'accumulo di metaboliti tossici nei linfociti
Deficit nella ricombinazione V(D)J		
Deficit di RAG1 o RAG2*	Linfociti T e B diminuiti; Ig sieriche diminuite; assenza o difetti a livello dei linfociti T e B	Deficit di processamento durante la ricombinazione V(D)J; mutazioni a carico dei geni RAG1 o RAG2
Riparazione della doppia elica e	Linfociti T e B diminuiti; Ig	Incapacità di "srotolare" le

punto di controllo	sieriche diminuite; assenza o difetti a livello dei linfociti T e B	strutture a forcina durante la ricombinazione V(D)J; mutazioni a carico dei geni *ARTEMIS*, DNA-PKcs, *CERNUNNOS, LIG4, NBS1, MRE11, ATM*
Deficit nello sviluppo timico		
Deficit nel “checkpoint” pre-TCR	Linfociti T diminuiti; linfociti B normali o diminuiti; Ig sieriche diminuite	Mutazioni nei geni *CD45, CD3D, CD3E, ORAI1* (componente di CRAC), *STIM1*
Sindrome di DiGeorge	Linfociti T diminuiti; linfociti B normali; Ig sieriche normali o diminuite	Delezione 22q11; mutazioni a carico del gene che codifica per T box-1 (TBX1)
Deficit di FoxN1	Aplasia del timo con deficit dello sviluppo dei timociti	Mutazione recessiva nel gene *FOXN1*
Deficit della catena α del TCR	Assenza di Linfociti T α/β, normali linfociti γ/δ, infezioni ricorrenti e autoimmunità	Delezione della regione C della catena α del *TCR* (autosomica recessiva)
Difetto nell’uscita dei linfociti T dal timo e alterata trasduzione del segnale nei linfociti T	Marcata riduzione dei linfociti T periferici	Mutazioni in *RHOH* e *MST1*
Perdita selettiva dei linfociti $CD4^+$ e difetto nella trasduzione del segnale nei linfociti T	Riduzione dei linfociti T $CD4^+$	Mutazioni nei geni *LCK* e *UNC119*
Altri deficit		
Disgenesia reticolare	Linfociti T e B e cellule mieloidi diminuiti	Mutazioni nel gene *AK2*

ADA (*Adenosine Deaminase*), adenosina deaminasi; AK2 (*Adenilate Kinase*), adenilato chinasi 2; ATM, *Ataxia-Telangiectasia Mutated*; CRAC, *Calcium Release Activated Channel*; DNA-PKcs, *DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit*; LIG4, DNA ligasi 4; MRE11, *Meiotic REcombination homologue 11*; NBS1, *Nijmegen Breakpoint Syndrome 1*; PNP (*Purine Nucleoside Phosphorylase*), fosforilasi nucleosidica purinica.

*Mutazioni ipomorfiche per geni RAG o ARTEMIS possono contribuire all’instaurarsi della sindrome di Omenn.

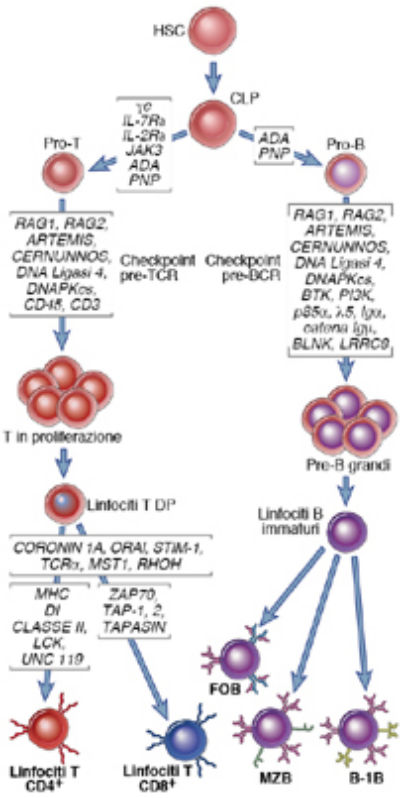


FIGURA 21-1 Immunodeficienze provocate da alterazioni nella maturazione dei linfociti B e T. La figura illustra le principali immunodeficienze primitive causate da deficit genetici nella maturazione dei linfociti. Tali deficit (*in corsivo*) possono compromettere la maturazione dei soli linfociti B, dei soli linfociti T oppure di entrambi. CLP (*Common Lymphoid Progenitor*), progenitore comune linfoide; DP, doppio positivo; FoB (*Follicular B Cells*), linfociti B follicolari; HSC (*Hematopoietic Stem Cell*), cellule staminali ematopoietiche; MZB (*Marginal Zone B Cells*), linfociti B della zona marginale.

La manifestazione clinica della SCID è caratterizzata da infezioni gravi potenzialmente fatali, tra cui polmonite, meningite e batteriemia diffusa. Lo *Pneumocystis jiroveci* è uno degli organismi più pericolosi, potendo causare polmonite grave. Questi pazienti tendono a contrarre infezioni gravi causate di virus diversi. Nei bambini sani, per esempio, l'infezione da varicella si limita di norma alla pelle e alle mucose e si resolve in qualche giorno; nei pazienti con SCID può invece progredire fino a interessare i polmoni, il fegato e il cervello. Le infezioni da citomegalovirus (CMV) si presentano generalmente in forma latente nella maggior parte delle persone, mentre nei pazienti con SCID il virus si può riattivare e causare una polmonite fatale. I bambini affetti da SCID tendono a contrarre infezioni gastrointestinali da rotavirus, da *Crytosporidium*, *Giardia lamblia* e *cytomegalovirus*, germi che causano diarrea persistente e malassorbimento.

I bambini affetti da SCID possono inoltre sviluppare infezioni causate da vaccini vivi attenuati, non nocivi per i bambini con immunità normale. I vaccini per la varicella, il morbillo, la parotite, la rosolia e il rotavirus sono vaccini virali vivi, e i bambini affetti da SCID possono contrarre infezioni a seguito della loro somministrazione.

I pazienti con SCID possono inoltre sviluppare una dermatite cronica, spesso confusa con un'infezione. L'eruzione è in realtà causata da una reazione di GVHD (*Graft Versus Host Disease*; reazione di trapianto verso l'ospite) in cui i linfociti T materni raggiungono il feto senza esserne respinti da quest'ultimo (perché il feto non possiede un sistema immunitario competente) e reagiscono contro i tessuti del bambino.

Le mutazioni dei geni coinvolti nelle diverse fasi dello sviluppo dei linfociti possono causare SCID. Il processo di maturazione dei linfociti T e B a partire dai precursori staminali ematopoietici fino a linfociti maturi e funzionalmente competenti richiede: 1) la proliferazione dei progenitori linfocitari; 2) il riarrangiamento dei loci genici codificanti per una delle catene del recettore per l'antigene; 3) la selezione positiva di quelle cellule che sono riuscite a effettuare i riarrangiamenti del recettore per l'antigene utili al superamento del cosiddetto checkpoint pre-recettore delle cellule T (*T Cells Receptor*, TCR); 4) l'espressione di entrambe le catene del TCR e la selezione dei linfociti con specificità antigenica utile (vedi Cap. 8). In diverse forme di SCID sono stati effettivamente riscontrati alcuni difetti in molti di questi passaggi. Circa il 50% dei casi di SCID è a trasmissione autosomica recessiva, mentre i rimanenti sono X-linked. La causa più frequente di SCID autosomica recessiva è il deficit dell'enzima adenosina deaminasi, che è necessario per il metabolismo purinico. Le forme di SCID a trasmissione X-linked sono causate da mutazioni dei geni codificanti per la subunità recettoriale nota come catena γ comune.

Sindrome di DiGeorge e altre forme di SCID causate da un difetto nello sviluppo dell'epitelio timico

Un deficit completo o parziale dello sviluppo dell'abbozzo timico può causare un difetto nella maturazione dei linfociti T. La forma più frequente di difetto di sviluppo timico associato a SCID si osserva nella ***sindrome di DiGeorge***. Questo deficit selettivo di linfociti T è dovuto a una

malformazione congenita che consiste in un difettoso sviluppo del timo, delle ghiandole paratiroidi e di altre strutture che originano dalla terza e quarta tasca branchiale durante la vita fetale. Si osservano, di conseguenza, un irregolare sviluppo dei grossi vasi, deformità facciali e l'assenza delle ghiandole paratiroidee, che causano alterazioni del metabolismo del calcio e un'anomala contrattilità muscolare (tetania). Per quanto riguarda l'ambito immunologico, si osservano ipoplasia o addirittura agenesia del timo, non compatibili con una normale maturazione dei linfociti T. Queste alterazioni possono manifestarsi nei vari pazienti con diversa gravità. Il difetto genetico alla loro base è riconducibile a una delezione nella regione cromosomica. Una linea murina che presenta un difetto simile nello sviluppo timico presenta una mutazione a livello di un gene che codifica per un fattore di trascrizione definito T-box-1 (TBX1), che mappa proprio nella regione deleta. È probabile che l'immunodeficienza associata alla sindrome di DiGeorge possa essere, almeno in parte, spiegata proprio dalla delezione del gene *TBX1*. In questa sindrome, infatti, i linfociti T del sangue periferico sono assenti o fortemente ridotti di numero e comunque le cellule residue non rispondono ai classici attivatori policlonali dei linfociti T, risultando quindi inattive nella reazione leucocitaria mista. Il livello di anticorpi è solitamente normale, ma può essere ridotto in quei pazienti nei quali la malattia sia particolarmente grave. Come in altri gravi deficit di cellule T, i pazienti sono molto suscettibili a infezioni virali, micobatteriche e fungine.

L'immunodeficienza che si accompagna alla sindrome di DiGeorge può essere corretta mediante il trapianto di timo fetale o di midollo osseo. Comunque, questo tipo di intervento non è di solito necessario poiché la funzione T tende a migliorare con il passare del tempo in un'ampia parte dei pazienti affetti da questa sindrome, fino alla sua normalizzazione intorno al quinto anno di vita. Questo recupero è probabilmente dovuto alla persistenza di "residui timici" o all'azione vicariante svolta da tessuti extratimici non meglio identificati che permettono lo svolgimento del processo di maturazione dei linfociti T. È anche possibile che durante la crescita di questi pazienti si sviluppi un tessuto timico in sede ectopica (ossia in una sede diversa da quella normale).

Un modello animale di deficit dei linfociti T legato ad alterazioni dello sviluppo del timo è rappresentato dal *topo nudo* (*atimico*). Questi animali sono caratterizzati da un difetto ereditario a carico di alcuni tipi di cellule

epiteliali cutanee, che causa da una parte l'assenza del pelo, dall'altra la mancanza del rivestimento della terza e della quarta tasca faringea, la quale determina ipoplasia timica. Il difetto è determinato da una mutazione del gene che codifica per il *FoxN1*, un fattore di trascrizione della famiglia forkhead necessario al corretto sviluppo di alcuni tipi cellulari di derivazione ectodermica. I topi nudi possiedono un timo rudimentale che però non garantisce la corretta maturazione dei linfociti T. Di conseguenza, nei tessuti linfoidi periferici, i linfociti T sono scarsi o addirittura assenti e le risposte immunitarie cellulo-mediate risultano compromesse. Mutazioni autosomiche recessive del gene *FOXN1* sono state descritte in un piccolo numero di pazienti che si presentano con SCID, alopecia (perdita di capelli) e distrofia ungueale.

Un difetto ancora più raro nella formazione del timo riguarda una mutazione nel gene *CORONIN-1A* che codifica per una proteina regolatrice del citoscheletro. Un difetto funzionale di *CORONIN-1A* comporta un deficit nell'uscita dei linfociti T maturi dal timo. Le mutazioni omozigotiche a carico del gene *MST1*, che codifica per una serina/treonina protein-chinasi, determinano l'assenza di linfociti T naïve nel circolo ematico e l'impossibilità per i linfociti T di emigrare dal timo. I pazienti presentano infezioni batteriche e virali ricorrenti e alcuni sviluppano linfomi a seguito dell'infezione provocata dal virus di Epstein-Barr (EBV). Alcuni pazienti presentano epidermodisplasia verruciforme, con verruche da HPV e carcinomi della pelle. MST1 svolge diversi ruoli nella prolificazione, sopravvivenza e migrazione cellulare. Sebbene il difetto maggiore riguardi la migrazione dei linfociti T dal timo, vi sono anche alcuni deficit dell'immunità umorale in quei pazienti che presentano una riduzione nel numero di linfociti B e ipogammaglobulinemia.

Deficit dell'adenosina deaminasi e altre forme di SCID causate da difetti del metabolismo nucleotidico

La forma più frequente di SCID autosomica recessiva è il deficit di un enzima noto come adenosina deaminasi (ADA) e dovuto a mutazioni del gene ADA. Questo enzima ADA interviene nel catabolismo delle purine e in particolare catalizza la deaminazione irreversibile dell'adenosina a inosina e della 2´-deossiadenosina a 2´-deossinosina. Il deficit dell'enzima porta

all'accumulo di deossiadenosina e dei suoi precursori S-adenosilomocisteina e deossiadenosina trifosfato. Questi metaboliti esercitano diversi effetti tossici, tra i quali l'inibizione della sintesi di DNA. I linfociti in corso di maturazione sono meno efficienti nel degradare la deossiadenosina trifosfato in 2´-deossiadenosina, sebbene ADA sia espressa nella maggior parte delle cellule. Ne consegue che la maturazione dei linfociti risulta particolarmente sensibile al deficit di ADA, determinando quindi una riduzione nel numero di linfociti B e T. Altre caratteriste della malattia sono sordità, anormalità costocondrali, epatopatia e disturbi comportamentali. La conta linfocitaria è solitamente normale alla nascita, ma diminuisce repentinamente durante il primo anno di vita. Alcuni pazienti possono presentare un numero di linfociti Tpressoché normale, ma tali cellule non sono in grado di proliferare in risposta alla stimolazione antigenica.

Un'altra forma di SCID autosomica recessiva più rara è dovuta al deficit di un altro enzima, la fosforilasi nucleo-sidica purinica (*Purine Nucleoside Phosphorylase*, PNP), anch'esso coinvolto nel catabolismo delle purine e che catalizza la conversione dell'inosina in ipoxantina e della guanosina in guanina. Il deficit di PNP causa l'accumulo di deossiguanosina e deossiguanosina trifosfato, che esercitano un effetto tossico principalmente sui linfociti T immaturi. Altre caratteristiche di questa malattia sono la comparsa di anemia emolitica autoimmune e il progressivo deterioramento neurologico.

Una forma particolarmente grave di SCID si osserva in una malattia nota come *disgenesia reticolare*. Questa rara condizione è caratterizzata dall'assenza di linfociti T e B e di cellule mieloidi come i granulociti ed è dovuta a un difetto nello sviluppo delle cellule staminali progenitrici linfoidi e mieloidi. Questa malattia autosomica recessiva è dovuta a mutazioni nel gene *adenilato chinasi 2* (*AK2*). La proteina AK2 regola i livelli di adenosina difosfato e in assenza dell'enzima AK2 si assiste a un aumento dell'apoptosi dei precursori linfoidi e mieloidi.

SCID X-linked

Le forme X-linked di SCID sono causate da mutazioni nel gene codificante per la catena comune γ (γ_c) dei recettori per le interleuchine IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15 (vedi Capp. 4, 9 e 10). La SCID legata al cromosoma X è

caratterizzata da un blocco della maturazione dei linfociti T e delle cellule NK che causa una drastica riduzione del numero delle forme mature e funzionali di queste cellule; al contrario, il numero di linfociti B è solitamente normale o addirittura aumentato. Nonostante ciò, nei pazienti affetti da SCID si osserva un deficit della risposta umorale, probabilmente causato dalla mancata cooperazione dei linfociti T helper alla produzione di anticorpi funzionali. La SCID legata al cromosoma X è principalmente dovuta all'incapacità dell'IL-7 di promuovere la crescita dei timociti immaturi. Infatti, IL-7 deve legarsi e attivare un recettore che usa la catena γ_c per trasdurre il segnale. Lo stesso meccanismo vale per l'IL-15, necessaria per lo sviluppo delle cellule NK, il che spiega il deficit delle cellule NK che caratterizza la SCID legata al cromosoma X.

Tali mutazioni sono recessive, quindi le femmine eterozigoti sono di solito portatrici sane, mentre i maschi che ereditano il cromosoma X con il gene alterato manifestano la malattia. Nelle femmine, durante lo sviluppo, le cellule inattivano in maniera casuale uno dei due cromosomi X, per questo motivo in un'eterozigote portatrice sana l'allele normale che codifica per la γ_c funzionale mancherà nella metà dei precursori linfocitari. Queste cellule non potranno completare il processo di maturazione e di conseguenza tutti i linfociti maturi di una donna portatrice sana non potranno che essere quelli che hanno inattivato il cromosoma X contenente l'allele mutato. A livello delle cellule non linfoidi, per le quali la catena γ_c non è essenziale, si riscontreranno invece metà cellule con il cromosoma X normale inattivato e l'altra metà con l'inattivazione di quello contenente l'allele mutato. Quindi, l'identificazione di donne portatrici sane dell'allele mutato può essere effettuata confrontando i profili di inattivazione del cromosoma X nelle cellule linfoidi rispetto a quelle non linfoidi. Come verrà descritto più avanti, l'inattivazione non casuale del cromosoma X nei linfociti maturi di donne portatrici sane avviene anche in presenza di altre mutazioni di geni coinvolti nello sviluppo dei linfociti e presenti sul cromosoma X.

Mutazioni autosomiche recessive che interferiscono con la trasduzione del segnale generato dalle citochine

Alcuni pazienti affetti da una patologia clinicamente identica alla SCID legata al cromosoma X mostrano però un'ereditarietà di tipo autosomico

recessivo. In questi pazienti sono state riscontrate mutazioni a carico dei geni che codificano per la *catena α del recettore per l'IL-7* (IL-7R) o per la *chinasi JAK3*, che si associa alla catena γ_c ed è necessaria alla trasduzione del segnale generato da questo recettore (vedi Cap. 7). Pazienti con mutazioni nel gene codificante per la subunitàa del recettore dell'IL-7 hanno un difetto nello sviluppo dei linfociti T, ma presentano un normale sviluppo delle cellule NK, in quanto la risposta funzionale all'IL-15 non è influenzata. Inoltre questi pazienti hanno un normale numero di linfociti B.

Immunodeficienza combinata grave causata da deficit della ricombinazione V(D)J o della trasduzione del segnale durante il punto di controllo pre-TCR

L'assenza di ricombinazione V(D)J porta a un difetto nell'espressione del recettore pre-T (pre-TCR) e del recettore pre-B (pre-BCR) e nel blocco dello sviluppo di linfociti T e B. Mutazioni dei geni *RAG1* o *RAG2*, che codificano per proteine coinvolte nei processi di taglio della ricombinazione V(D)J, o *ARTEMIS*, che codifica per un'endonucleasi che processa le strutture a "forcina" (*hairpin*) poste alle estremità codificanti dei segmenti V(D)J comportano un difetto del processo di ricombinazione V(D)J e, sebbene siano rare, esse sono responsabili della gran parte delle forme di SCID autosomiche recessive. Le funzioni di questi geni sono state discusse nel Capitolo 8. Nei bambini portatori di queste mutazioni, i linfociti B e T sono assenti e la risposta immunitaria è di conseguenza gravemente compromessa. Mutazioni nei geni che codificano per proteine coinvolte nei processi di riparazione delle rotture del DNA e nell'unione non omologa delle estremità di DNA possono anche determinare condizioni di SCID per via dei difetti di ricombinazione V(D)J. Mutazioni in omozigosi dei geni che codificano per le subunità catalitiche delle proteine chinasi DNA-dipendenti (DNA-PK) e per la DNA LIGASI 4 determinano SCID. I difetti genetici a carico delle molecole coinvolte in questo processo comportano un'aumentata sensibilità alle radiazioni e possono determinare altre manifestazioni, quali microcefalia, dismorfie facciali e difetti dello sviluppo dentario.

Mutazioni ipomorfiche (che riducono solo parzialmente la funzione) dei geni *RAG*, per *ARTEMIS* o per l' *IL-7RA* possono causare un disturbo denominato *sindrome di Omenn* caratterizzato da una ridotta generazione di

linfociti T e B, immunodeficienza e manifestazioni allergiche e autoimmuni. La sindrome di Omenn è fenotipicamente distinta dalle altre sinora descritte in quanto l'immunodeficienza coesiste con attivazioni immunitarie abnormi e autoimmunità. Ciò può essere determinato da un rapporto eccessivamente basso tra i linfociti T regolatori e i linfociti T effettori nei casi in cui vi sia un difetto nella ricombinazione V(D)J, da un difettivo editing recettoriale dei linfociti B immaturi.

Nonostante la maggior parte delle forme autosomiche recessive di SCID sia associata a mutazioni dei geni *ADA*, *RAG1*, *RAG2* e *ARTEMIS*, altre forme di questa sindrome sono causate da mutazioni a carico dei geni che codificano per CD45 fosfatasi (che è un regolatore positivo delle chinasi della famiglia Src, tra cui vi sono Fyn, Lck e Lyn) o da mutazioni delle catene δ ed ε di CD3 o nella catena ζ associata a CD3. Queste mutazioni contribuiscono a un difetto di trasduzione del complesso pre-TCR determinando un blocco nello sviluppo dei linfociti T che esprimono il recettore αβ. Un altro disturbo nello sviluppo dei linfociti T naïve è causato da mutazioni in omozigosi del membro H della famiglia dei geni omologhi Ras (*Ras HOmologous gene family member H*, RHOH), un'atipica GTPasi della famiglia Rho necessaria per la trasduzione dei segnali pre-TCR e TCR. Un difetto a carico del checkpoint del pre-TCR determina l'arresto dello sviluppo dei linfociti T αβ. La manifestazione clinica include epidermodisplasia verruciforme, un'infezione da HPV della pelle che causa la comparsa di macule e papule.

Un difetto specifico nello sviluppo dei linfociti T αβ e una presentazione clinica che implica infezioni virali ricorrenti è causata da mutazioni in omozigosi nel gene che codifica per la regione costante del recettore della catena α dei linfociti T (TCRαβ). Gli individui affetti presentano un'aumentata suscettibilità alle infezioni, incluse le infezioni croniche da varicella zoster e EBV, nonché manifestazioni autoimmuni e atopia. La disregolazione immunitaria può riflettere l'assenza di linfociti T regolatori; gli unici linfociti T presenti nei bambini affetti da questa malattia sono i linfociti T γδ. Le caratteristiche cliniche includono eosinofilia, vitiligine, eczema, alopecia areata, anemia emolitica autoimmune e la presenza di altri autoanticorpi.

Anche le mutazioni recessive in LCK, un'importante tirosin-chinasi coinvolta nella trasduzione del segnale pre-TCR e TCR, contribuiscono alla

SCID con un deficit dei linfociti T, assenza di linfociti T regolatori, infezioni ricorrenti e manifestazioni di disregolazione immunitaria.

Sindrome del linfocita nudo e altri deficit nella selezione positiva dei linfociti T

La formazione dei linfociti T $CD4^+$ o $CD8^+$ singolo-positivi a partire dai timociti doppio-positivi ($CD4^+/CD8^+$) dipende dalla selezione positiva e da processi differenziativi specifici. Le mutazioni dei geni che regolano il processo di selezione positiva impediscono lo sviluppo dei linfociti T $CD4^+$ o dei linfociti $CD8^+$.

Il deficit di espressione di molecole MHC di classe II, noto anche come ***sindrome del linfocita nudo***, comprende un gruppo eterogeneo di malattie rare autosomiche recessive. I pazienti mostrano ridotta o assente espressione delle molecole HLA-DP, -DQ o -DR sui linfociti B, macrofagi e cellule dendritiche e incapacità di esprimere molecole MHC di classe II in risposta all'IFN-γ. I pazienti esprimono invece livelli normali o lievemente ridotti di molecole MHC di classe I e di β_2-microglobulina. La maggior parte dei casi di sindrome del linfocita nudo è causata da mutazioni a carico dei geni che codificano per fattori di trascrizione che regolano la sintesi delle molecole MHC di classe II. Per esempio, le mutazioni del gene che codifica per il fattore di trascrizione RFX5 (che in condizioni fisiologiche viene espresso costitutivamente) o per il fattore transattivante CIITA (che in condizioni fisiologiche è indotto dalla stimolazione con l'IFN-γ) causano la ridotta espressione di molecole MHC di classe II sulle APC e conseguentemente l'impossibilità di attivare i linfociti T $CD4^+$. Mancando la funzione di presentazione dell'antigene, a livello timico si sviluppa un processo di selezione positiva deficitario, a sua volta responsabile della riduzione numerica di linfociti T $CD4^+$ maturi e/o della loro insufficiente attivazione periferica. Gli individui affetti dalla sindrome del linfocita nudo mostrano deficit delle risposte DTH e della produzione di anticorpi diretti contro antigeni proteici T-dipendenti. La malattia fa il suo esordio già entro il primo anno di vita ed è di solito fatale, a meno che non si intervenga con un trapianto di midollo.

Sono stati descritti deficit di espressione delle molecole MHC di classe I a trasmissione autosomica recessiva, caratterizzati dalla riduzione del

numero e/o dall'insufficiente funzionalità dei linfociti T $CD8^+$. In alcuni casi questo deficit è dovuto a mutazioni a carico dei geni che codificano per le subunità *TAP-1* e *TAP-2* del complesso TAP (*Transporter associated with Antigens Processing*) deputato al trasporto dei peptidi antigenici nel reticolo endoplasmatico, dove sono assemblati insieme alle molecole MHC di classe I (vedi Cap. 6). Dal momento che le molecole MHC sono degradate all'interno delle cellule, i pazienti con deficit del complesso TAP presentano un ridotto livello di molecole MHC di classe I sulla superficie cellulare, un fenotipo simile a quanto si osserva nei topi knockout per il gene *TAP*. In effetti, i pazienti sono soggetti a infezioni granulomatose necrotizzanti della cute e a infezioni batteriche del tratto respiratorio ma non a infezioni virali. Ciò è sorprendente se si considera che la funzione principale dei linfociti T $CD8^+$ consiste, invece, proprio nella difesa contro i virus e non contro i batteri. Un deficit di espressione delle molecole MHC di classe I è stato osservato anche in pazienti con mutazioni del gene che codifica per la proteina tapasina (vedi Cap. 6).

I pazienti con deficit di ZAP-70 hanno un difetto di sviluppo specifico per una particolare linea differenziativa che comporta un difetto dei linfociti $CD8^+$ ma non dei linfociti $CD4^+$; la causa alla base di questo difetto non è chiara. Il difetto di questa tirosina chinasi non compromette lo sviluppo dei linfociti T $CD4^+$ o la loro migrazione verso la periferia; tuttavia, questi linfociti $CD4^+$ sono incapaci di proliferare normalmente quando stimolati dagli antigeni. La presentazione clinica comprende infezioni virali e fungine.

Le mutazioni negative dominanti in omozigosi per il gene che codifica per UNC119 (*Uncoordinated 119*), una proteina che trasporta le proteine miristilate verso la membrana plasmatica (tra cui LCK), determina una linfopenia di $CD4^+$. LCK si lega più strettamente a CD4 rispetto a CD8 e, nel contesto di questo disturbo, è probabile che una carenza di LCK alla superficie cellulare determini un deficit nella selezione positiva dei linfociti T $CD4^+$.La presentazione clinica comprende infezioni fungine e virali ricorrenti.

SCID causate da deficit di attivazione dei linfociti T

Un'altra rara forma di SCID è causata da una mutazione del gene che codifica per Orai1, un componente dei canali del calcio CRAC (*Calcium*

Release-Activated Calcium) (vedi Cap. 7). In effetti, l'attivazione del TCR, così come del pre-TCR, porta all'attivazione dell'isoforma γ della fosfolipasi C (PLCγ) e al rilascio di ioni calcio dal reticolo endoplasmatico e dai mitocondri a opera dell'inositolo trifosfato (IP3) (vedi Cap. 7). Le riserve di calcio rilasciato vengono rimpiazzate attraverso il richiamo di calcio extracellulare operato dai canali CRAC. Tale processo, cruciale per l'attivazione dei linfociti, viene compromesso nelle cellule che portano la mutazione su *ORAI1*. Un fenotipo simile si osserva nei pazienti con mutazioni del gene *STIM1*, che codifica per una proteina del reticolo endoplasmatico che è sensibile alla deplezione dei depositi di calcio e che contribuisce all'apertura dei canali CRAC. I pazienti con mutazioni dei geni *ORAI1* o *STIM1* non presentano difetti dello sviluppo dei linfociti T, ma i loro linfociti T non vengono attivati in modo appropriato.

Deficit anticorpali: difetti di maturazione e attivazione dei linfociti B

I deficit dello sviluppo dei linfociti T o di entrambi i linfociti T e B contribuiscono al fenotipo SCID, mentre i deficit circoscritti allo sviluppo e alla funzione dei soli linfociti B contribuiscono all'insorgenza di disordini in cui il principale difetto riguarda la produzione di anticorpi (Tab. 21-4 e Fig. 21-2). Alcune di queste malattie sono causate da difetti dello sviluppo dei linfociti B (vedi Fig. 21-1), mentre altre da difetti nell'attivazione e nella sintesi di anticorpi da parte dei linfociti B (Fig. 21-2). Comunque, almeno in un sottotipo di sindrome iper-IgM (vedi più avanti) il deficit anticorpale si accompagna a deficit dell'attivazione di macrofagi e APC, che, a loro volta, compromettono le risposte immunitarie cellulo-mediate.

TABELLA 21-4 Deficit anticorpali

Malattia	Deficit funzionali	Basi molecolari del deficit
Agammaglobulinemia		
Legata al cromosoma X	Diminuzione di tutti gli isotipi di Ig sieriche; diminuzione del numero di linfociti B	Difetti nel checkpoint del recettore pre-B; mutazione a carico del gene che codifica per la proteina Btk
Forme autosomiche recessive	Diminuzione di tutti gli isotipi di Ig sieriche; diminuzione del numero di linfociti B	Difetti nel checkpoint del recettore pre-B; mutazione a carico dei geni che codificano per la catena

		pesante (μ) delle IgM, per le catene leggere (*λ5*), per *Igα* o per *BLNK p85α*
Ipogammaglobulinemia/Deficit isotipici selettivi		
Deficit selettivo di IgA	Diminuzione di IgA; possono essere associate ad aumentata suscettibilità a infezioni da parte di batteri e protozoi come *Giardia lamblia*	Mutazioni a carico del gene *TACI* (in alcuni pazienti)
Deficit selettivo di IgG2	Aumentata suscettibilità a infezioni batteriche	Un limitato numero di pazienti mostra una delezione nel locus genico IgH γ2
Immunodeficienza comune variabile	Ipogammaglobulinemia; linfociti B normali o diminuiti	Mutazioni a carico dei geni *ICOS* e *TACI* (in alcuni pazienti)
Sindrome ICF	Ipogammaglobulinemia; occasionalmente blandi difetti a carico dei linfociti T	Mutazioni nel gene *DNMT3B*
Sindrome iper-IgM		
Legata al cromosoma X	Deficit nell'attivazione dei linfociti B, dei macrofagi e delle cellule dendritiche mediata dai linfociti T; deficit nelle mutazioni somatiche, nello scambio di classe e nella formazione dei centri germinativi; deficit dell'immunità cellulo-mediata	Mutazioni nel gene *CD40L*
Forma autosomica recessiva associata a deficit dell'immunità cellulo-mediata	Deficit nell'attivazione dei linfociti B, dei macrofagi e delle cellule dendritiche mediata dai linfociti T; deficit nelle mutazioni somatiche, nello scambio di classe e nella formazione dei centri germinativi; deficit dell'immunità cellulo-mediata	Mutazioni nei geni *CD40*, *NEMO*
Forma autosomica recessiva associata a deficit anticorpale	Deficit nelle mutazioni somatiche e nello scambio di classe	Mutazioni nei geni *AID*, *UNG*

AID (*Activation-Induced cytidine Deaminase*), deaminasi indotta dalla attivazione; DNMT3B, *DNA MethylTransferase 3B*; ICF, *Immunodeficiencies-Centromeric Instability-Facial anomalies*; ICOS, *Inducible COStimulator*; NEMO, *NF-κB Essential MOodulator*; TACI, *Transmembrane Activator and Calcium Modulator and cyclophilin ligand Interactor*; UNG, *Uracil N-Glycosylase*.

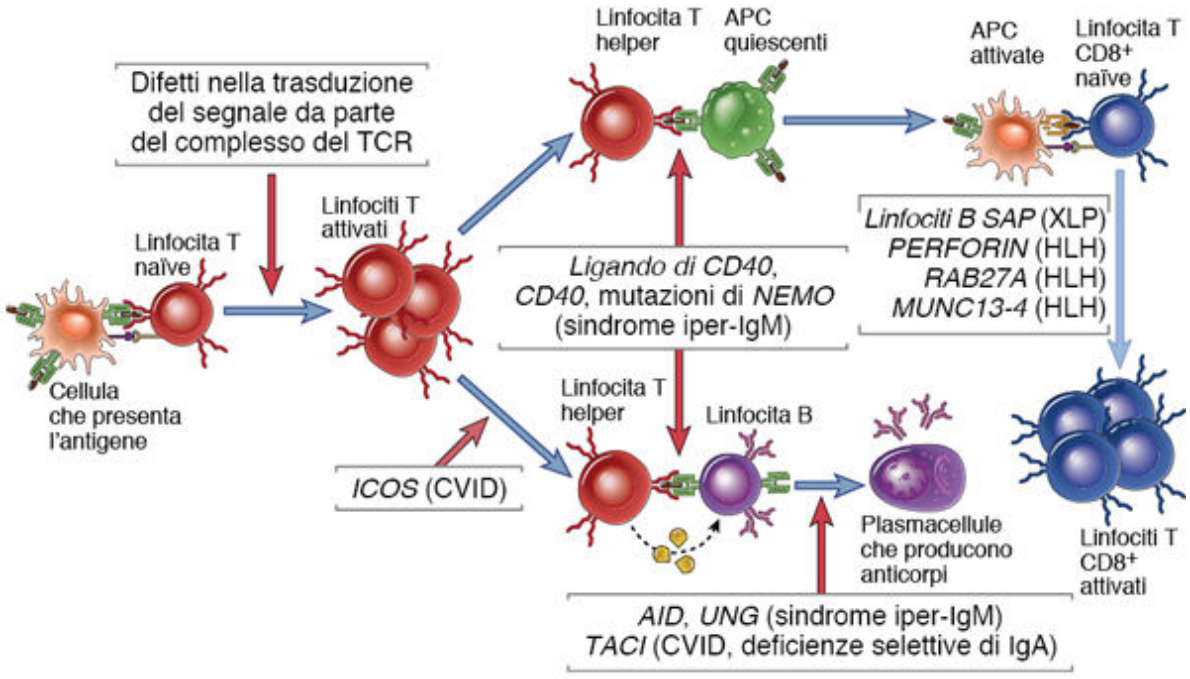


FIGURA 21-2 Immunodeficienze causate dai deficit di attivazione dei linfociti B e T. Le immunodeficienze primarie possono essere causate da deficit genetici che compromettono l'espressione di molecole necessarie alla trasduzione del segnale generato dal recettore per l'antigene dei linfociti B; all'attivazione dei linfociti B da parte dei linfociti T helper e dalle APC; all'attivazione dei linfociti T citotossici e delle cellule NK. CVID (*Common Variable Imunodeficiency*), immunodeficienza comune variabile; HLH (*Hemophagocytic LymphoHistiocytosis*), linfoistocitosi emofagocitica.

Deficit della trasduzione del segnale generato dal recettore per l'antigene dei linfociti pre-B legato al cromosoma X: agammaglobulinemia legata al cromosoma X

L'agammaglobulinemia legata al cromosoma X, altrimenti definita agammaglobulinemia di Bruton, è causata da mutazioni o delezioni del gene codificante per un enzima noto come tirosina chinasi di Bruton (* Bruton's tyrosine kinase, *Btk) che comporta un arresto nella differenziazione dei linfociti B nel midollo osseo allo stadio di linfocita pre-B (vedi Fig. 21-1). La malattia è caratterizzata dalla completa assenza di γ-globuline nel siero, come d'altronde suggerito dal nome. Si tratta di una delle immunodeficienze congenite più comuni e rappresenta il prototipo dei deficit della maturazione dei linfociti B. Il difetto alla base dell'agammaglobulinemia legata al cromosoma X è l'incapacità dei linfociti B di maturare oltre lo stadio pre-B (vedi Fig. 20-1). Questo blocco

maturativo è causato dalla delezione o da altre mutazioni del gene che codifica per l'enzima Btk, coinvolto nella trasduzione del segnale del pre-BCR necessario per la sopravvivenza e la differenziazione dei linfociti pre-B (vedi Cap. 8). Nelle donne portatrici di questo trait genetico maturano soltanto i linfociti B che hanno inattivato il cromosoma X con l'allele mutato. I pazienti affetti da agammaglobulinemia legata al sesso presentano: 1) livelli serici di Ig molto bassi o addirittura non misurabili; 2) riduzione numerica o assenza di linfociti B sia nel sangue periferico sia nei tessuti linfoidi; 3) mancato sviluppo dei centri germinativi nei linfonodi e assenza di plasmacellule nei tessuti. Al contrario, la maturazione, il numero e le funzioni dei linfociti T sono generalmente normali. In realtà, in alcuni soggetti è stato evidenziato anche un deficit di linfociti T probabilmente dovuto a un'inefficiente presentazione antigenica a sua volta causata dall'assenza di linfociti B. In circa il 20% dei pazienti affetti da agammaglobulinemia legata al cromosoma X si sviluppano manifestazioni di tipo autoimmunitario, delle quali però non sono ancora note le cause. Le complicanze infettive dell'agammaglobulinemia legata al sesso possono essere ragionevolmente controllate dall'infusione periodica (settimanale o mensile) di γ-globuline. Questi medicamenti contengono anticorpi preformati rivolti verso gli agenti patogeni più comuni e conferiscono al paziente un'efficace immunità passiva.

Topi knockout per il gene che codifica per Btk, così come topi portatori di mutazioni spontanee dello stesso gene (topi *Xid*), mostrano un deficit della maturazione dei linfociti B che è meno grave rispetto ai corrispettivi umani. Ciò avviene poiché nel topo la mancanza della tirosina Btk viene almeno parzialmente compensata da una tirosina chinasi simile, definita Tec. Le principali anomalie nel topo *Xid* sono una risposta anticorpale deficitaria verso gli antigeni di natura polisaccaridica e un deficit dei linfociti B follicolari maturi e dei linfociti B-1.

Deficit autosomico recessivo della trasduzione del segnale durante il checkpoint pre-BCR

Sono state descritte alcune forme autosomiche recessive di agammaglobulinemia, molte delle quali si associano a difetti nella trasduzione del segnale generato dal pre-BCR. Tra i geni mutati che causano

tale disordine sono stati individuati quelli codificanti per la catena pesante (μ) delle IgM, per la catena leggera λ5, per l'Igα (la catena responsabile della trasduzione del segnale generato dal pre-BCR e dal BCR), per la subunità p85α della PI3 chinasi e per la proteina BLNK (*B cell Linker*) che è un importante adattatore a valle della via di trasduzione del segnale generata dal pre-BCR e dal BCR.

Deficit selettivi di isotipi immunoglobulinici

Sono state descritte numerose immunodeficienze che interessano in modo selettivo uno o più isotipi di Ig. Tra queste la più frequente è il deficit selettivo di IgA, che nella popolazione caucasica colpisce circa 1 individuo su 700, rappresentando in assoluto l'immunodeficienza primaria più frequente. Il **deficit selettivo di IgA** si verifica sporadicamente, ma sono state descritte anche forme ereditarie autosomiche dominanti o autosomiche recessive. Le sue caratteristiche cliniche sono estremamente variabili; si passa da individui completamente asintomatici a pazienti che manifestano occasionali infezioni respiratorie e diarrea. Più raramente, i pazienti manifestano gravi infezioni ricorrenti che possono portare a danni permanenti dei tratti gastrointestinale e respiratorio, ai quali si associano anche manifestazioni autoimmunitarie. Le manifestazioni riflettono l'importanza delle IgA secretorie per la protezione della barriera contro i microbi patogeni e commensali (vedi Cap. 14). A livello diagnostico, il deficit selettivo di IgA è caratterizzato da livelli sierici di IgA molto bassi, generalmente inferiori a 50 μg/ml (rispetto a valori normali pari a 2-4 mg/ml), associati a livelli normali o addirittura elevati di IgM e IgG e bassi livelli di IgA nelle secrezioni delle mucose. Il difetto che causa il deficit selettivo di IgA consiste nel blocco della differenziazione dei linfociti B in plasmacellule secernenti IgA. Infatti, a livello molecolare i geni per la catena pesante α, così come l'espressione di IgA di membrana, sono normali. In questi pazienti non si riportano evidenti anomalie nel numero, nel fenotipo e nelle risposte funzionali da parte dei linfociti T. Solo in una piccola frazione di pazienti sono state descritte mutazioni del gene che codifica per *TACI* (*Transmembrane Activator and Calcium modulator and cyclophilin ligand Interactor*), uno dei tre recettori per le citochine BAFF (*B cell Activating Factor*) e APRIL (*A PRoliferation-Inducing Ligand*), entrambe le quali

stimolano la sopravvivenza e la proliferazione dei linfociti B, sebbene in fasi diverse della loro differenziazione. Le mutazioni del gene *TACI* sono anche un'importante causa di immunodeficienza comune variabile (vedi più avanti).

Deficit selettivi di alcune sottoclassi di IgG sono stati descritti in alcuni individui che mostrano livelli sierici normali di IgG totali, ma concentrazioni al di sotto del normale di una o più sottoclassi. Il deficit di IgG3 è il più frequente nell'adulto, mentre nei bambini si ritrova più spesso il deficit di IgG2 associato a quello di IgA. Alcuni pazienti affetti da questi deficit sono soggetti a infezioni batteriche ricorrenti, sebbene nella maggior parte dei casi non si evidenzino manifestazioni cliniche. I deficit selettivi delle sottoclassi di IgG sono generalmente dovuti ad anomalie della differenziazione dei linfociti B, in rari casi determinata da una delezione omozigote dei geni che codificano per le regioni costanti (C_γ).

Deficit di differenziazione dei linfociti B: immunodeficienza comune variabile

L'immunodeficienza comune variabile (**Common Variable Immunodeficiency**, ***CVID) individua un gruppo eterogeneo di disordini caratterizzati da ipogammaglobulinemia, inefficiente risposta anticorpale alle infezioni e alle vaccinazioni e aumentata incidenza delle infezioni***. Di solito la diagnosi viene fatta per esclusione delle altre forme di immunodeficienza primaria. Come suggerisce il nome, sia il quadro clinico sia la patogenesi delle CVID sono estremamente variabili. A parte i già citati deficit di anticorpi e l'aumentata suscettibilità alle infezioni piogeniche, tipicamente da *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*, queste immunodeficienze possono essere caratterizzate anche da manifestazioni autoimmunitarie come l'anemia perniciosa, l'anemia emolitica e l'artrite reumatoide. Le immunodeficienze comuni variabili possono infine accompagnarsi anche a un'aumentata incidenza di neoplasie, in particolare di linfomi. L'esordio della malattia può avvenire già nella prima infanzia o più tardi nel corso della vita. Sono stati descritti sia casi sporadici sia casi ereditari a trasmissione autosomica dominante o recessiva. In qualsiasi caso, le basi genetiche di questa malattia non sono ancora state caratterizzate. I livelli di linfociti B maturi in circolo sono solitamente normali, ma nei

tessuti linfoidi periferici le plasmacellule sono assenti, suggerendo che la malattia sia dovuta al blocco della differenziazione dei linfociti B in cellule che producono gli anticorpi.

Le cause dell'ipogammaglobulinemia potrebbero essere diverse: anomalie intrinseche al linfocita B, alterazioni della funzione dei linfociti T helper. Una piccola frazione di pazienti affetti da CVID condivide una delezione del gene che codifica per *ICOS* (*Inducible T cell COStimulator*). ICOS è necessario per la generazione dei linfociti T helper follicolari (vedi Cap. 12). Un'altra causa ancora più diffusa di questi disordini è rappresentata dalle mutazioni del gene che codifica per il recettore *TACI*, già citato precedentemente nel contesto del deficitselettivo di IgA. Altre cause meno comuni dell'immunodeficienza comune variabile sono le mutazioni del gene *CD19*. CD19 è un componente della via di trasduzione del complesso corerecettoriale CR2 (CD21) (vedi Cap. 7).

Deficit di attivazione dei linfociti B dovuto ai linfociti T: sindrome iper-IgM

La sindrome iper-IgM legata al cromosoma X è una rara malattia causata da un'alterazione del linfocita B che ne compromette la capacità di portare a termine lo scambio di classe verso IgG e IgA. La produzione di questi anticorpi risulta quindi assente, con un conseguente aumento compensatorio di IgM circolanti. A livello molecolare la malattia è causata da mutazioni del gene che codifica per il ligando di CD40 (CD40L). La forma mutata di CD40L perde così la capacità di legarsi a CD40 del linfocita B e/o di trasdurre il segnale generato da tale legame. Viene così a mancare nei linfociti B lo stimolo per lo scambio isotipico fornito dai linfociti T helper (vedi Cap. 12). Oltre a una maggiore suscettibilità alle infezioni (che li accomuna a pazienti affetti da altre ipogammaglobulinemie), i pazienti con sindrome iper-IgM legata al sesso manifestano anche un deficit dell'immunità cellulo-mediata, evidenziato da una spiccata suscettibilità all'infezione da parte del microrganismo intracellulare *Pneumocystis jiroveci*. Questo deficit dell'immunità cellulo-mediata si verifica in quanto CD40L è coinvolto anche nell'attivazione dei macrofagi da parte dei linfociti T (vedi Cap. 10). In effetti, topi knockout per i geni che codificano per

CD40 o per CD40L presentano un fenotipo simile a quello dei pazienti affetti dalla sindrome iper-IgM legata al cromosoma X.

Esistono infine rari casi di sindrome iper-IgM a trasmissione autosomica recessiva. Le mutazioni che causano questi disordini potrebbero localizzarsi sui geni che codificano per CD40 oppure per la deaminasi indotta dall'attivatore (*Activation-Induced Deaminase*, AID), un enzima coinvolto nei processi di scambio isotipico e di maturazione dell'affinità (vedi Cap. 12). Le mutazioni di AID sono generalmente autosomiche recessive, ma una piccola parte di pazienti portatori di mutazioni a carico della regione del gene *AID*, che corrisponde alla porzione C-terminale dell'enzima, presentano un pattern di trasmissione autosomico dominante. Una forma della sindrome iper-IgM è causata da mutazioni autosomiche recessive a carico del gene che codifica la *N*- glicosilasi dell'uracile (*Uracil N-Glycosylase*, UNG; vedi Cap. 12), un enzima che rimuove i residui di uracile dai geni delle Ig durante lo scambio di classe e le mutazioni somatiche. Un altro disordine ereditario, l'EDA-ID, che causa una sindrome iper-IgM e difetti delle strutture ectodermiche, è dovuto a mutazioni ipomorfiche del fattore nucleare *NEMO* ed è descritto nell'ambito dei deficitdell'immunità innata.

Le mutazioni dei geni *AID* e *UNG* influenzano il processo di ricombinazione della classe isotipica e della permutazione somatica, sebbene con modalità diverse. In assenza di AID, sia lo scambio isotipico sia la permutazione somatica sono difettive, in quanto AID è assolutamente necessario per entrambi i processi. In assenza del gene UNG, lo scambio isotipico è difettivo ma l'ipermutazione somatica è sostanzialmente conservata, sebbene si osservi una minore frequenza di mutazioni A: T. Il ruolo delle mutazioni dei geni coinvolti nella riparazione del DNA nei difetti dello scambio isotipico sarà discusso più avanti in questo capitolo, quando si parlerà dell'atassia-telangiectasia.

Deficit di attivazione e funzionalità dei linfociti T

Grazie alla sempre maggiore comprensione delle basi molecolari responsabili dell'attivazione dei linfociti, si stanno identificando e caratterizzando sempre più anomalie congenite del processo di attivazione dei linfociti T(Tab. 21-5). Tra queste anomalie sono presenti alcuni disordini

della composizione dei granuli e della loro esocitosi da parte dei CTL e delle cellule NK. I difetti di espressione del complesso MHC sono stati classificati come disordini dello sviluppo dei linfociti T, tuttavia queste condizioni comportano anche un difetto di attivazione dei linfociti T che sono incapaci di maturare e migrare dal timo verso la periferia.

TABELLA 21-5 Deficit nell'attivazione dei linfociti T

Malattia	Deficit funzionali	Basi molecolari del deficit
Difetti nell'espressione dell'MHC		
Sindrome del linfocita nudo	Ridotta espressione dell'MHC di classe II e deficit nei linfociti T $CD4^+$; deficit dell'immunità cellulo-mediata e nelle risposte immuni umorali dipendenti dai linfociti T	Deficit nei fattori di trascrizione che regolano l'espressione genica degli MHC di classe II, inclusi *CIITA*, *RFXANK*, *RFX5*, e *RFXAP*
Deficit a carico dell'MHC di classe I	Ridotti livelli dell'MHC di classe I; riduzione del numero di linfociti T $CD8^+$	Mutazioni nei geni *TAP1*, *TAP2*, *TAPASIN*
Deficit della trasduzione del segnale nei linfociti T		
Deficit degli eventi precoci della trasduzione del segnale da parte del TCR	Deficit dell'immunità cellulo-mediata e dell'immunità umorale dipendente dai linfociti T	Mutazioni nei geni *CD3*, *CD45*, *STIM1*, *ORAI1*
Sindrome di Wiskott-Aldrich	Deficit nell'attivazione dei linfociti T e nella migrazione dei leucociti	Deficit del riarrangiamento dell'actina e del citoscheletro indotti dal TCR, causati da mutazioni a carico del gene *WASP*
Linfoistocitosi emofagocitica familiare		
Sindrome linfoproliferativa legata al cromosoma X	Abnorme proliferazione dei linfociti B indotta dall'EBV; abnorme attivazione dei macrofagi e dei CTL; deficit nella funzionalità delle cellule NK e dei CTL	Mutazioni nel gene *SAP*
Deficit di perforina	Abnorme attivazione dei macrofagi e dei CTL; deficit nella funzionalità delle cellule NK e dei CTL	Mutazioni nel gene *PERFORIN*
Deficit di fusione dei granuli	Abnorme attivazione dei macrofagi e	Deficit nell'esocitosi dei

	dei CTL; deficit nella funzionalità delle cellule NK e dei CTL	granuli citotossici; mutazioni a carico dei geni *RAB27A*, *MUNC13-4*, *SYNTAXIN*, *AP3* (e per *LYST* nella sindrome di Chédiak-Higashi; vedi Tab. 20-2)

AP3, *Adaptor-related Protein complex 3*; LYST, *LYSosomal Trafficking regulator protein*; SAP, *SLAM-Associated Protein*; TAP, *Transporter Associated with antigen Processing*; WASP, *Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*.

Deficit nella trasduzione del segnale del TCR

Sono state descritte diverse rare immunodeficienze causate da deficit di espressione di molecole necessarie all'attivazione e alla funzione dei linfociti T. Le moderne tecniche di analisi biochimica e molecolare hanno rivelato in questi pazienti mutazioni nei geni che codificano per diverse proteine dei linfociti T (vedi Tab. 21-5). Tra queste, le mutazioni dei geni che codificano per CD3 ε o γ (che impediscono l'espressione del complesso TCR o che ne compromettono la funzionalità), per la proteina *ZAP-70* (che ne compromettono il ruolo di secondo messaggero), per fattori di trascrizione (che solitamente portano alla riduzione della sintesi di citochine come l'IL-2 e IFN-γ oppure delle subunità del recettore per l'IL-2). Tali difetti però si riscontrano solo in pochi casi isolati o al limite in ristretti gruppi familiari. In tali individui, il tipo e la gravità delle manifestazioni cliniche variano ampiamente. In effetti i pazienti possono manifestare deficit solo a livello della funzione T oppure deficit misti T e B nonostante un numero normale o addirittura elevato di linfociti circolanti. Alcuni di questi deficit sono caratterizzati da rapporti anomali tra numero di linfociti $CD4^+$ e $CD8^+$ che potrebbero riflettere una compromissione selettiva dello sviluppo timico di una delle due sottopopolazioni oppure della loro espansione nel sistema immunitario periferico. Abbiamo considerato in precedenza nel contesto delle SCID l'importanza del complesso recettoriale CD3, RHOH e LCK ai fini del checkpoint pre-TCR, del ruolo delle mutazioni di *ZAP-70* nello sviluppo dei linfociti CD8, il ruolo delle mutazioni di LCK e UNC119 nello sviluppo dei linfociti T $CD4^+$ e il significato delle mutazioni di *ORAI1* e *STIM1* nell'attivazione dei linfociti T. Qui ci occuperemo delle altre sindromi che riguardano l'attivazione dei linfociti T maturi.

Sindrome di Wiskott-Aldrich

Alcune malattie congenite che coinvolgono diversi organi possono anche manifestare un grado variabile di immunodeficienza B e T. Un esempio di questo tipo di disordini è la sindrome di Wiskott-Aldrich, una malattia ereditaria legata al cromosoma X e caratterizzata da eczema, trombocitopenia (riduzione del numero delle piastrine nel sangue) e aumentata suscettibilità alle infezioni batteriche. Alcune di queste manifestazioni patologiche fanno risalire le loro cause principalmente a livello di un deficit di attivazione dei linfociti T, anche se una perdita della funzione B sembra poter contribuire alla loro patogenesi. Negli stadi iniziali della malattia, il numero dei linfociti è normale e il principale deficit è rappresentato dall'incapacità di produrre anticorpi diretti contro gli antigeni polisaccaridici T-indipendenti (questa è la ragione per cui i pazienti manifestano un'aumentata suscettibilità alle infezioni da parte di batteri piogeni capsulati). Inoltre, sia i linfociti sia le piastrine hanno dimensioni inferiori alla norma. Con il progredire dell'età, i pazienti sviluppano anche deficit del numero di linfociti circolanti e, conseguentemente, un aggravamento dell'immunodeficienza.

Il gene mutato responsabile della sindrome di Wiskott-Aldrich codifica per una proteina definita WASP (*Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*), espressa esclusivamente da cellule di derivazione midollare. Tale proteina interagisce con altre proteine, incluse molecole adattatrici come Grb-2 (vedi Cap. 7), il complesso Arp2/3 coinvolto nella polimerizzazione dell'actina e le proteine G a basso peso molecolare appartenenti alla famiglia Rho, coinvolte nella riorganizzazione dell'actina del citoscheletro. I deficit di formazione delle sinapsi immunologiche nei linfociti, così come i deficit di migrazione di tutti i leucociti, possono anch'essi contribuire all'immunodeficienza osservata nellasindrome di Wiskott-Aldrich.

È stata inoltre osservata una malattia autosomica recessiva simile alla sindrome di Wiskott-Aldrich, causata da mutazioni del gene che codifica per WIP (*WASP-Interacting Protein*), una proteina che si lega a WASP e la stabilizza.

Malattia linfoproliferativa legata al cromosoma X

La malattia linfoproliferativa legata al cromosoma X è una sindrome caratterizzata dall'incapacità di eradicare l'infezione da EBV, una situazione che può causare l'insorgenza di mononucleosi fulminante e/o lo sviluppo di linfomi a cellule B. Nell'80% dei casi la malattia è dovuta alla mutazione di un gene che codifica per una molecola adattatrice definita SAP (*SLAM-Associated Protein*) che si lega a una famiglia di molecole di membrana coinvolte nell'attivazione delle cellule NK e dei linfociti T e B, delle quali SLAM (*Signaling Lymphocyte Activation Molecule*) è la prototipica. In particolare, sulla membrana cellulare la proteina SAP connette SLAM e 2B4 alla proteina chinasi Fyn, che fa parte della famiglia delle chinasi Src (vedi Cap. 7). Deficit della proteina SAP contribuiscono al deficit di attivazione delle cellule NK e dei linfociti T, aumentando la suscettibilità alle infezioni virali. Come si è visto nel Capitolo 12, SAP è necessaria per lo sviluppo delle cellule T helper follicolari (T_{FH}) e il difetto dei pazienti affetti dalla malattia linfoproliferativa legata al cromosoma X di formare centri germinativi e di produrre anticorpi ad alta affinità contribuisce alla ipogammaglobulinemia e alla suscettibilità alle infezioni virali. Nel 20% circa dei casi il difetto genetico non risiede nel gene che codifica per SAP bensì in quello che codifica per XIAP (*X-linked Inhibitor of APoptosis*). Il conseguente incremento dell'apoptosi di cellule NK e linfociti T porta a una marcata riduzione del numero di queste cellule nei pazienti. L'immunodeficienza associata alla malattia linfoproliferativa legata al cromosoma Xsi manifesta comunemente come grave infezione da EBV che insorge opportunisticamente a causa della natura ubiquitaria delle cellule NK.

Deficit della funzione dei CTL e delle cellule NK: linfoistiocitosi emofagocitica familiare

La linfoistiocitosi emofagocitica familiare (*Hemophagocytic LymphoHistiocytosis*, HLH) costituisce un gruppo di immunodeficienze in cui le cellule NK e i CTL non sono in grado di uccidere le cellule infettate. Nell'HLH risulta però deficitaria la secrezione dei granuli da parte dei CTL e delle cellule NK. Come conseguenza, le infezioni virali non vengono controllate, con conseguente eccessiva attivazione macrofagica compensatoria, che costituisce la caratteristica peculiare della malattia.

Un’impressionante caratteristica che si manifesta tardivamente nei pazienti affetti da HLH è la fagocitosi dei globuli rossi da parte dei macrofagi (emofagocitosi). Le mutazioni del gene che codifica per la perforina sono la causa più comune di HLH, così come quelle dei geni che codificano per le proteine cellulari coinvolte nell’esocitosi dei granuli e che si osservano in alcuni di questi pazienti. In particolare, mutazioni nei geni *RAB27A* (che codificano per una guanosina trifosfatasi a basso peso molecolare coinvolta nella fusione dei vacuoli intracellulari) o *MUNC13-4* (che codificano per un adattatore che partecipa all’esocitosi dei granuli) compromettono la fusione dei granuli litici con la membrana plasmatica, contribuendo così a vari sottotipi di HLH. Analogamente, anche le mutazioni del gene che codifica per il componente del complesso adattatore citosolico AP-3 possono compromettere il trasporto intracellulare delle vescicole, contribuendo a una specifica forma di HLH. Si ritiene che i linfociti T e le cellule NK svolgano un ruolo significativo in risposta ai microbi persistenti, secernendo IFN-γ. In assenza di attività citotossica, tuttavia, le cellule CTL e NK non sono in grado di eliminare l'infezione, e l’eccessiva attivazione macrofagica da parte di IFN-γ dà origine ai fenomeni di emofagocitosi e linfoadenopatia nel contesto dell’immunodeficienza.

Malattie multisistemiche associate a immunodeficienza

L’immunodeficienza rappresenta solitamente solo uno dei sintomi della costellazione che caratterizza numerosi disordini ereditari. Esempi di tali disordini già discussi (vedi sopra) sono le sindromi di Chédiak-Higashi, di Wiskott-Aldrich e di DiGeorge.

Atassia-telangiectasia

L’atassia-telangiectasia è una malattia autosomica recessiva caratterizzata da alterazioni della postura (atassia), malformazioni vascolari (teleangiectasia), lesioni neurologiche, aumentata incidenza di tumori e immunodeficienza. Quest’ultima può essere di gravità variabile, andando a interessare sia i linfociti B sia i linfociti T. Il difetto umorale più comune è il deficit di IgA e IgG2, probabilmente per il ruolo cruciale svolto da una proteina chiamata ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*) nello scambio di classe isotipica. I deficit a carico dei linfociti T, generalmente meno pronunciati, si

accompagnano a ipoplasia timica. I pazienti soffrono di infezioni batteriche ricorrenti delle vie aeree superiori e inferiori, sviluppano diversi tipi di reazioni autoimmunitarie e, con il procedere dell'età, aumenta l'incidenza di tumori.

L'ATM è una chinasi strutturalmente correlata alla fosfatidilinositolo 3-chinasi. Questa proteina regola l'apoptosi e i diversi checkpoint del ciclo cellulare in risposta a danni del DNA a doppia elica. È stato inoltre dimostrato che contribuisce anche alla stabilità di quest'ultimo durante il processo di ricombinazione V(D)J. Nella sindrome di Wiskott-Aldrich, queste anomalie nel processo di riparazione del DNA spiegano le anomalie nel processo di generazione dei recettori per l'antigene dei linfociti T. Inoltre, l'ATM contribuisce alla stabilità del DNA quando, nel corso della ricombinazione per scambio isotipico, si vengono a generare danni, le mutazioni di ATM determinano un deficit nello scambio di classe e si hanno livelli ridotti di IgG, IgA e IgE.

Approcci terapeutici alle immunodeficienze congenite

L'intervento terapeutico delle immunodeficienze ha il duplice scopo di controllare le infezioni e reintegrare la componente difettosa o assente del sistema immunitario attraverso il trasferimento adottivo o il trapianto. In effetti, l'immunizzazione passiva con γ-globuline rappresenta tuttora la principale opzione terapeutica per i pazienti affetti da agammaglobulinemie ed effettivamente ha salvato la vita di molti bambini affetti da queste patologie. Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche è invece considerato il trattamento d'elezione per diverse immunodeficienze ed è già stato applicato con successo in casi di SCID, di deficit diADA, nella sindrome di Wiskott-Aldrich, in quella dellinfocita nudo e nel deficit di adesione leucocitaria. Ovviamente, l'efficienza del trapianto di midollo è tanto maggiore quanto migliore è la compatibilità HLA e quanto più efficiente è l'eliminazione dei linfociti T maturi dal midollo del donatore per prevenire l'insorgenza della reazione del trapianto verso l'ospite (vedi Cap. 17). Nei casi di deficit di ADA e di PNP si sono provate terapie sostitutive nelle quali gli enzimi carenti venivano forniti attraverso trasfusione di globuli rossi. Quando sono stati provati in pazienti affetti da SCID autosomica, questi trattamenti hanno però fornito solo temporanei

miglioramenti clinici. Benefici clinici di breve durata sono stati ottenuti anche con la somministrazione di ADA bovina coniugata a polietilenglicole per prolungarne l'emivita nel siero.

In linea teorica, la migliore terapia per la cura delle immunodeficienze congenite è la terapia genica, che consiste nella sostituzione del gene difettoso/assente con il gene normale a livello dei precursori staminali midollari. Nonostante i considerevoli sforzi, la terapia genica per la cura delle immunodeficienze continua a rimanere solo un obiettivo teorico. I principali ostacoli nella sua messa a punto consistono nella difficoltà di isolare le cellule staminali (che rappresentano il bersaglio ideale per l'inserimento del gene sostitutivo) e di introdurre il gene sostitutivo nella posizione che ne assicuri la stabilità e l'espressione persistente nel tempo. In aggiunta, l'ospite deve essere condizionato tramite deplezione delle cellule del midollo osseo per favorire l'attecchimento delle cellule staminali, cosa che comporta rischi infettivi in quanto implica una temporanea riduzione delle cellule ematiche. Si è ottenuto un miglioramento nei risultati di terapia genica per il deficit di ADA attraverso l'uso di blandi regimi di condizionamento. Finora, un ristretto gruppo di pazienti affetti da SCID legata al cromosoma X è stato trattato con successo con il trapianto autologo di midollo modificato con tecniche di ingegneria genetica a esprimere una catena γ_C normale. Una piccola percentuale di questi pazienti ha tuttavia sviluppato una forma di leucemia apparentemente dovuta all'inserimento del gene sostitutivo in posizione adiacente a un oncogene, promuovendone la trascrizione incontrollata. D'altra parte, per motivi ancora sconosciuti, la terapia genica non ha avuto successo nei pazienti affetti da SCID autosomica causata da deficit di ADA.

Lo sviluppo di vettori lentivirali auto-inattivanti ha ridotto il rischio di mutagenesi inserzionali e di recente alcune terapie geniche hanno avuto successo, in modo particolare in caso di ADA-SCID.

IMMUNODEFICIENZE ACQUISITE (SECONDARIE)

Le immunodeficienze si sviluppano frequentemente in seguito ad alterazioni non ereditate bensì acquisite durante il corso della vita (Tab. 21-6). In generale, i meccanismi patogenetici attraverso i quali si sviluppano le immunodeficienze acquisite sono diversi. In prima istanza, l'immunosoppressione si verifica come conseguenza di una malattia pregressa. In secondo luogo, si può sviluppare la complicanza di terapie somministrate per la cura di altre patologie (immunodeficienze iatrogene). Infine, l'immunodeficienza può essere acquisita tramite un'infezione che interessa le cellule del sistema immunitario, tra le quali la più importante è l'infezione da HIV, descritta separatamente più avanti nel proseguo del capitolo.

TABELLA 21-6 Immunodeficienze acquisite

Causa	Meccanismo
Infezione da parte dell'HIV	Diminuzione del numero di linfociti T $CD4^+$ helper
Malnutrizione calorico-proteica	Diminuzione del numero dei precursori midollari leucocitari
Trattamenti radio- o chemioterapici per la cura delle neoplasie	Diminuzione del numero dei precursori midollari leucocitari
Metastasi e leucemie che coinvolgono il midollo osseo	Riduzione anatomica del tessuto dove avviene lo sviluppo dei linfociti
Immunosoppressione per trapianto, malattie autoimmuni	Ridotta attivazione linfocitaria
Rimozione della milza	Ridotta fagocitosi microbica

Le malattie nelle quali l'immunodeficienza rappresenta una complicanza abbastanza frequente sono le neoplasie, le infezioni e gli stati di malnutrizione. La malnutrizione calorico-proteica, estremamente comune nei Paesi in via di sviluppo, si associa frequentemente a deficit dell'immunità cellulare e umorale. Tali deficit comportano una minore resistenza alle infezioni che effettivamente rappresentano la prima causa di malattia e di morte degli individui denutriti. Le basi molecolari di queste immunodeficienze non sono ancora state chiarite, tuttavia è ragionevole presumere che le alterazioni metaboliche generalizzate causate dall'inadeguato apporto di proteine, vitamine, lipidi e minerali possano

compromettere la corretta maturazione e la funzionalità delle cellule del sistema immunitario.

Nel caso di pazienti terminali con neoplasie disseminate, la suscettibilità alle infezioni aumenta a causa dei deficit nelle risposte cellulari e umorali a diversi microrganismi che si instaurano con il progredire della malattia. In effetti, i tumori primitivi, le metastasi e le leucemie che insorgono nel midollo osseo compromettono la normale crescita e la maturazione dei linfociti e dei leucociti. Inoltre, il tumore può rilasciare molecole che interferiscono con lo sviluppo e la funzione dei linfociti. Un chiaro esempio di immunodeficienza associata a neoplasia è rappresentato dalla compromissione della funzione dei linfociti T, che si accompagna a un particolare tipo di linfoma definito morbo diHodgkin. I pazienti non sono in grado di generare risposte DTH in seguito all'inoculo intradermico di antigeni ambientali o verso i quali erano già stati sensibilizzati (tra questi *Candida* e il tossoide tetanico). Nei pazienti affetti dal morbo di Hodgkin risultano alterati anche i risultati di alcuni saggi di attività dei linfociti T (come la risposta proliferativa agli attivatori policlonali). Questo deficit delle risposte immunitarie cellulo-mediate, di cui non si conoscono con precisione le basi molecolari, è definito anergia.

Anche diversi tipi di infezioni determinano l'immunosoppressione. Oltre all'HIV, anche le infezioni da parte di altri virus compromettono le risposte immunitarie. Per esempio, il virus del morbillo e il virus T linfotropico di tipo I(*Human T cell Lymphotropic Virus 1*, HTLV-1) sono in grado di infettare i linfociti, capacità che potrebbe essere alla base del loro effetto immunosoppressivo. Come l'HIV, anche l'HTLV-1 è un retrovirus dotato di tropismo selettivo per i linfociti T $CD4^+$. Questo virus tuttavia, invece di causare la morte dei linfociti T helper, ne induce la trasformazione, causando una neoplasia particolarmente aggressiva che prende il nome di leucemia/linfoma a cellule T dell'adulto (*Adult T cell Leukemia/Lymphoma*, ATL). I pazienti affetti da tale neoplasia manifestano solitamente una forte immunodepressione che li espone a infezioni opportunistiche ricorrenti. In effetti, le infezioni croniche da *Mycobacterium tuberculosis* e da numerosi miceti si accompagnano frequentemente all'anergia verso numerosi antigeni. Infine, anche le infezioni parassitarie croniche possono causare immunodepressione, come dimostra il deficit della funzione dei linfociti T che si osserva frequentemente nei bambini africani affetti da malaria. Tale

deficit potrebbe inoltre spiegare la maggiore incidenza dei tumori maligni associati all'EBV in questi pazienti.

L'immunosoppressione iatrogena è spesso causata da terapie farmacologiche che uccidono o inattivano i linfociti. Alcuni farmaci vengono somministrati intenzionalmente proprio a tale scopo, sia per curare le malattie infiammatorie sia per prevenire il rigetto di un allotrapianto. I farmaci antinfiammatori e immunosoppressivi più comunemente impiegati sono i corticosteroidi e la ciclosporina, ma oggi anche altri farmaci sono largamente utilizzati (vedi Capp. 17 e 19). I farmaci chemioterapici vengono largamente utilizzati per la cura delle neoplasie, in quanto esercitano un effetto citotossico nei confronti delle cellule proliferanti, tra cui i linfociti maturi e in via di sviluppo, nonché altri precursori dei leucociti. Le chemioterapie si accompagnano quindi sempre a immunosoppressione transitoria con un incremento del rischio di infezioni. La radioterapia, anch'essa impiegata per la cura dei tumori, comporta gli stessi rischi.

L'asportazione chirurgica della milza che si rende necessaria in seguito a traumi, ad alcune malattie ematologiche oppure all'anemia falciforme (che causa l'infarto splenico) si accompagna a immunodeficienza. In effetti, pazienti splenectomizzati sono più suscettibili alle infezioni da parte di microrganismi capsulati come *Streptococcus pneumoniae*. Ciò è dovuto in parte alla mancanza del processo di eliminazione da parte dei fagociti dei microrganismi opsonizzati presenti nel circolo ematico (un processo che avviene principalmente nella milza) e in parte a causa del deficit della risposta anticorpale determinato dalla mancanza di linfociti B della zona marginale.

VIRUS DELL'IMMUNODEFICIENZA UMANA E SINDROME DELL'IMMUNODEFICIENZA ACQUISITA

L'AIDS, causata dall'infezione da parte dell'HIV, è caratterizzata da un grave deficit immunologico cui si accompagnano infezioni opportunistiche ricorrenti, tumori maligni, degenerazioni del sistema nervoso centrale e un grave deperimento organico. L'HIV è in grado di infettare diverse cellule del

sistema immunitario, quali i linfociti T helper $CD4^+$, i macrofagi e le cellule dendritiche. Questo virus si è evoluto come patogeno per l'uomo molto più recentemente rispetto a tanti altri agenti infettivi. In effetti, i primi casi di tale infezione sono stati descritti a partire dagli anni Ottanta del XX secolo. Ciononostante, la gravità dell'AIDS, la sua mortalità e il suo impatto sulla sanità pubblica e sull'economia globale sono già enormi e in continuo progresso. Nel mondo, l'HIV ha già infettato tra i 50 e i 60 milioni di persone e ha già causato la morte di più di 25 milioni tra adulti e bambini. A oggi, circa 35 milioni di persone risultano infettate dall'HIV o ammalate di AIDS. Di questi, circa il 70% vive in Africa e il 20% in Asia. Si stima che circa 1-2 milioni di persone muoiano ogni anno a causa dell'AIDS. La malattia è particolarmente temibile perché circa metà dei 3 milioni di nuovi casi che si verificano ogni anno riguardano giovani adulti (da 14 a 25 anni di età). Come risultato, l'AIDS ha già lasciato circa 14 milioni di orfani. Non esistono attualmente immunizzazioni profilattiche né cure definitive per l'AIDS, ma sono invece disponibili nuovi ed efficaci farmaci antiretrovirali in grado di controllare l'infezione. In questa parte del capitolo descriveremo le caratteristiche dell'HIV, la patogenesi dell'immunodeficienza indotta dall'HIV e delle altre patologie a esso associate, oltre che le sue caratteristiche epidemiologiche.

Caratteristiche molecolari e biologiche dell'HIV

L'HIV è un retrovirus appartenente alla famiglia dei lentivirus che comprende anche il virus visna degli ovini e i virus dell'immunodeficienza bovina, felina e della scimmia. Tutti questi virus sono in grado di infettare e mantenere una prolungata latenza nelle cellule bersaglio, oltre che di esercitare sulle stesse un effetto citopatico acuto; tutti causano malattie mortali a lenta progressione che si manifestano con grave deperimento organico e degenerazione del sistema nervoso centrale. Sono stati finora identificati due tipi di HIV (HIV-1 e HIV-2) strettamente correlati tra loro, ma diversi per struttura genomica e antigenicità. L'HIV-1 è di gran lunga la causa più comune dell'AIDS, ma anche l'HIV-2, che differisce per struttura genomica e antigenicità, può causare una forma di AIDS che presenta una progressione di malattia più lenta della malattia correlata all'HIV-1.

Struttura e geni dell'HIV

Una particella infettante (virione) dell'HIV è composta da due eliche identiche di RNA contenute all'interno di un nucleo di proteine virali circondato a sua volta da un rivestimento (envelope) a doppio strato fosfolipidico, derivante dalla membrana della cellula ospite ma contenente anche proteine codificate dal genoma virale (Fig. 21-3). Il genoma a RNA dell'HIV è lungo circa 9,2 kb ed è organizzato secondo la struttura basilare dei retrovirus (Fig. 21-4). In dettaglio, a entrambe le estremità del genoma sono presenti le sequenze LTR (*Long Terminal Repeat*) che regolano l'integrazione, l'espressione genica e la replicazione del virus. Una sequenza nucleotidica denominata *gag* codifica per le proteine strutturali del nucleo virale (core). Le sequenze *env* codificano invece per le glicoproteine dell'envelope (gp 120 e gp 41) che si associano reciprocamente per via non covalente e che sono essenziali per l'infettività del virus. Le sequenze *pol* codificano per gli enzimi trascrittasi inversa, integrasi e proteasi, necessari per la replicazione virale. Oltre a questi geni tipici di tutti i retrovirus, il genoma dell'HIV-1 possiede altri sei geni a funzione regolatrice, denominati *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr* e *vpu*, i cui prodotti controllano la replicazione virale attraverso vari meccanismi. Le funzioni di tutti i geni dell'HIV-1 sono riassunte nella Figura 21-4 e discusse più avanti.

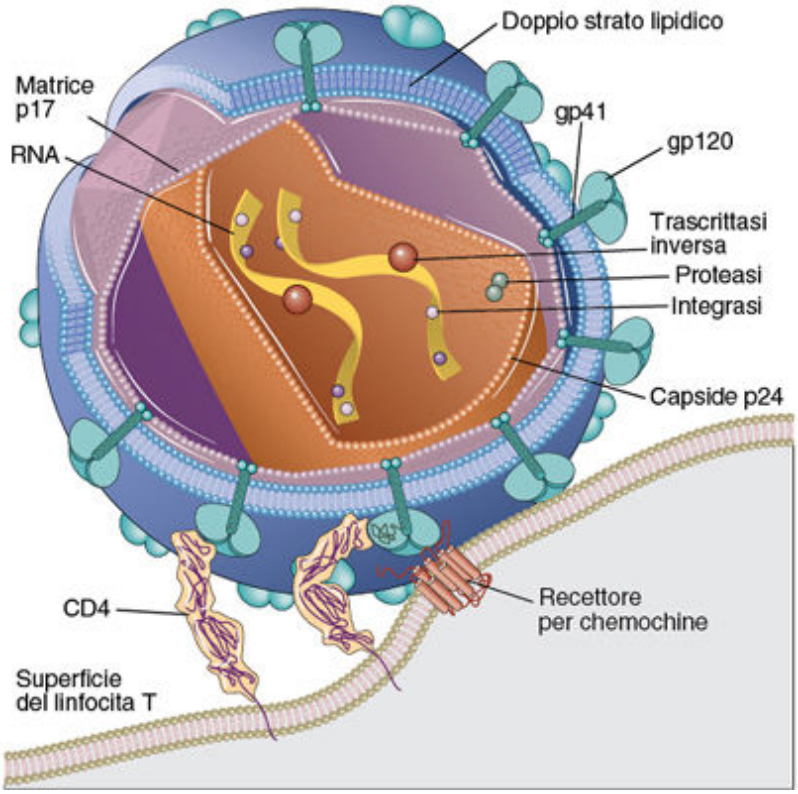


FIGURA 21-3 Struttura dell'HIV-1. La figura mostra un virione di HIV-1 che prende contatto con la superficie di un linfocita T CD4 $^{+}$. L'HIV-1 è formato da due eliche identiche di RNA (che costituiscono il suo genoma virale) e da alcuni enzimi (la trascrittasi inversa, l'integrasi e la proteasi) impacchettati in un nucleo (core) a forma di cono composto dalla proteina del capside p24 circondata dalla proteina di matrice p17. Questa struttura è a sua volta circondata da un involucro fosfolipidico (envelope) derivato dalla membrana della cellula ospite, ma contenente due proteine codificate dal virus (gp41 e gp120). CD4 e alcuni recettori per le chemochine presenti sulla superficie della cellula bersaglio funzionano da recettori per l'HIV-1. (*Copyright © 2000 Terese Winslow.*)

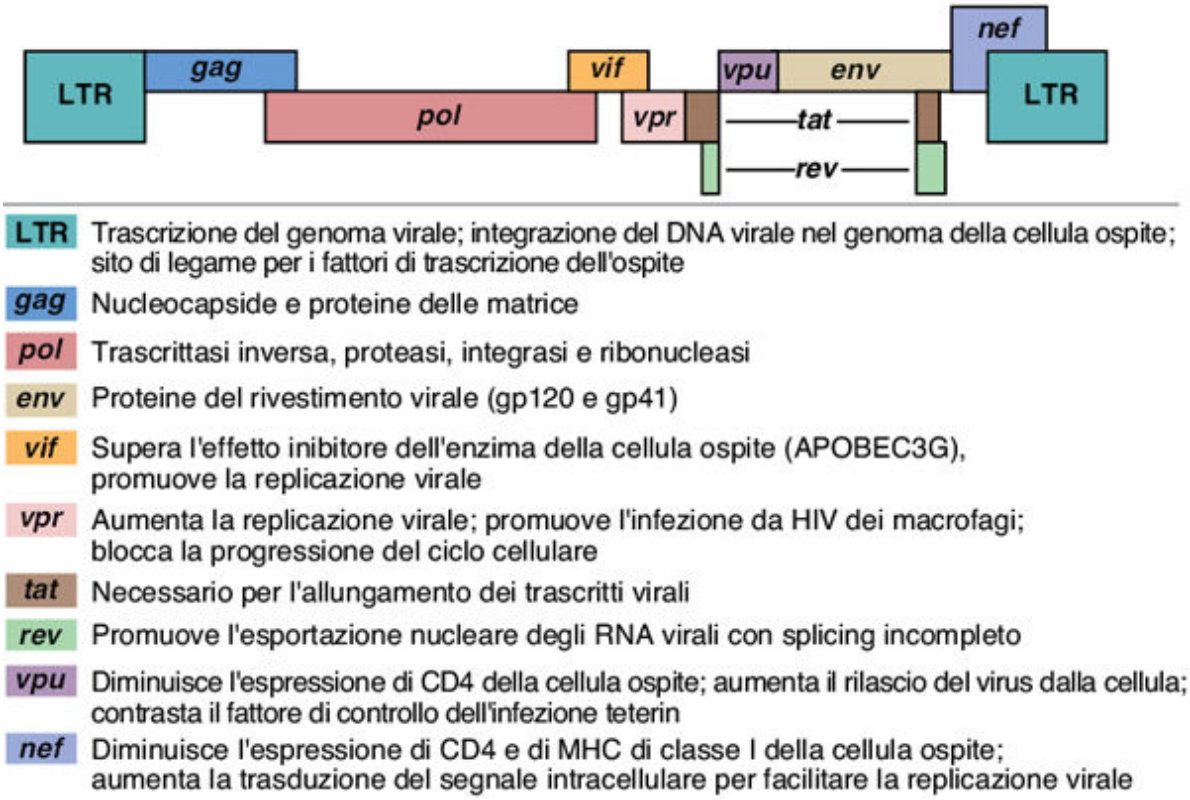


FIGURA 21-4 Il genoma dell'HIV-1. La posizione dei vari geni dell'HIV è indicata con rettangoli di diverso colore. Come evidenziato dalla sovrapposizione di alcuni di questi rettangoli, alcuni geni dell'HIV condividono sequenze comuni, che comunque vengono trascritte separatamente dall'RNA polimerasi della cellula ospite. I rettangoli di uguale colore uniti da linee indicano i geni le cui sequenze codificanti sono separate nel genoma del virus, ma vengono riunite nell'mRNA virale dopo l'opportuno splicing. env, envelope; gag, antigene gruppo-specifico; LTR, lunghe sequenze terminali ripetute; nef, effettore negativo; pol, polimerasi; rev, regolatore dell'espressione genetica virale; tat, attivatore trascrizionale; vif, fattore di infettività virale; vpr, proteina virale R; vpu, proteina virale u. (*Adattata da Greene W. AIDS and the immune system. Copyright © 1993 by Scientific American, Inc. Tutti i diritti riservati.*)

Ciclo biologico dell'HIV

L'infezione da parte dell'HIV inizia con l'interazione del complesso glicoproteico gp120 con due proteine delle cellule dell'ospite, CD4 e i corecettori appartenenti alla famiglia dei recettori per le chemochine espressi su un linfocita T helper (Fig. 21-5). I virioni dai quali inizia l'infezione sono solitamente presenti nel sangue, nello sperma o in altri liquidi corporei e possono essere trasmessi da un individuo all'altro per contatto sessuale, attraverso punture con aghi infetti o attraverso il passaggio transplacentare da madre a figlio. Il complesso glicoproteico virale

dell’envelope, chiamato Env, è composto da una subunità transmembrana gp41 e una subunità esterna gp120 associata in maniera non covalente. Entrambe le subunità sono prodotte per clivaggio proteolitico del precursore gp160. L’Env è espresso sulla superficie del virione in forma trimerica e media una serie di tappe sequenziali che si concludono con la fusione dell’envelope virale con la membrana della cellula bersaglio (Fig. 21-6). La prima tappa di questo processo è il legame della subunità gp120 a CD4. Ciò provoca nella proteina virale una modificazione conformazionale che favorisce il suo successivo legame ad alcuni recettori per le chemochine. Questo secondo legame induce una modificazione conformazionale nella subunità gp41 che a sua volta determina l’esposizione di una regione idrofobica denominata peptide di fusione, in grado di inserirsi nella membrana cellulare, promuovendone la fusione con l’envelope virale. A conclusione di un ciclo vitale del virus nella cellula infettata (vedi più avanti), verranno liberati nuovi virioni in grado di legarsi ad altre cellule non infettate, propagando l’infezione. Le subunità gp120 e gp41 vengono inoltre espresse sulla membrana plasmatica delle cellule infettate anche prima che il virus venga rilasciato e possono mediare la fusione tra una cellula infettata e una non infettata esprimente CD4 e i corecettori. In questo modo il genoma dell’HIV può passare direttamente da una cellula all’altra. L’identificazione di CD4 e dei recettori per le chemochine, come i recettori per l’HIV, poggia su numerose evidenze sperimentali e cliniche.

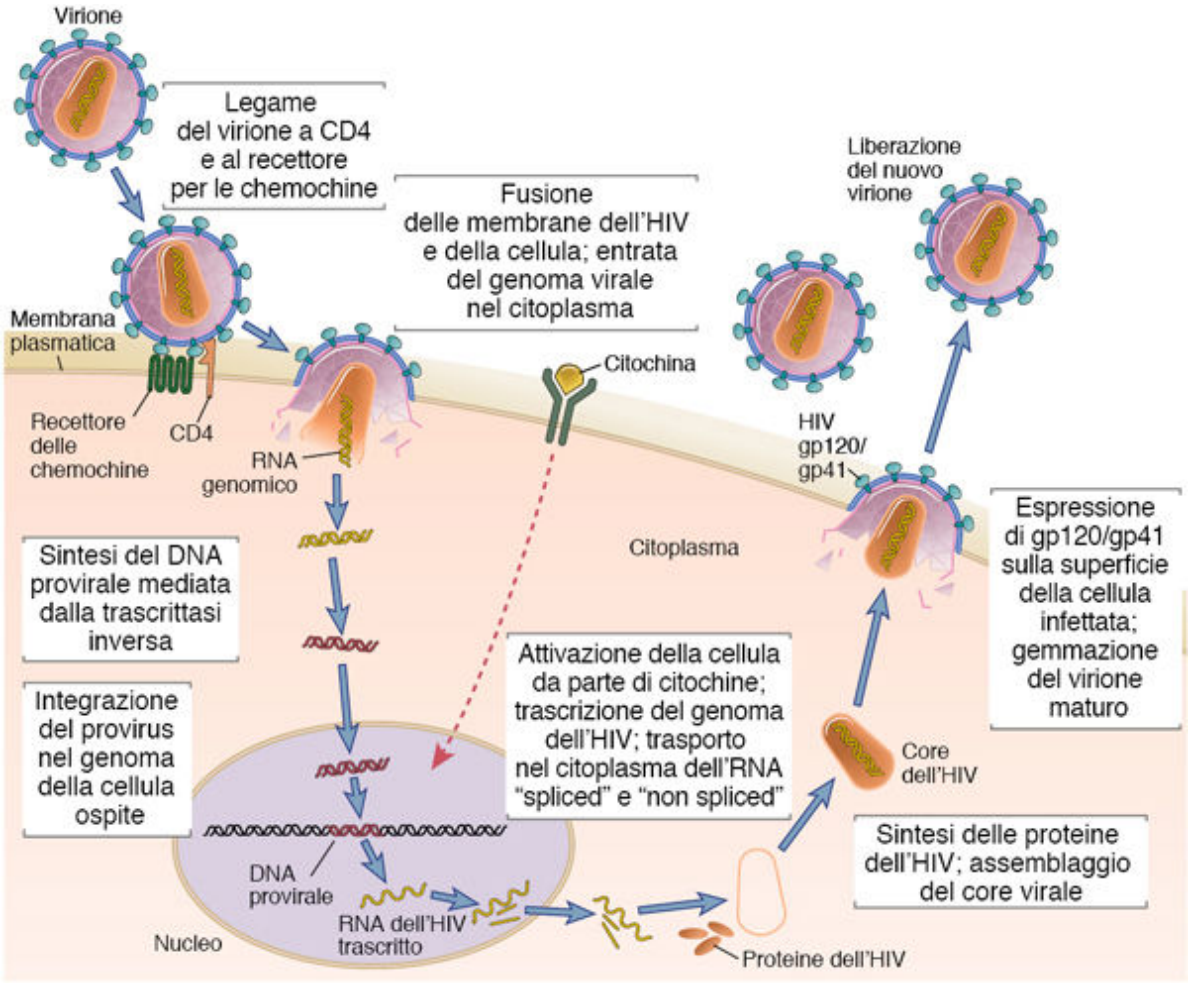


FIGURA 21-5 Ciclo biologico dell'HIV. La figura illustra le tappe del ciclo vitale dell'HIV, partendo dall'infezione della cellula ospite, passando per la replicazione del virus, fino al rilascio di nuovi virioni. Per maggiore chiarezza, nella figura vengono mostrati la replicazione e il rilascio di un solo virione, ma in realtà una cellula infettata produce molti virioni contemporaneamente e ognuno di essi è capace di infettare altre cellule, amplificando la diffusione del virus.

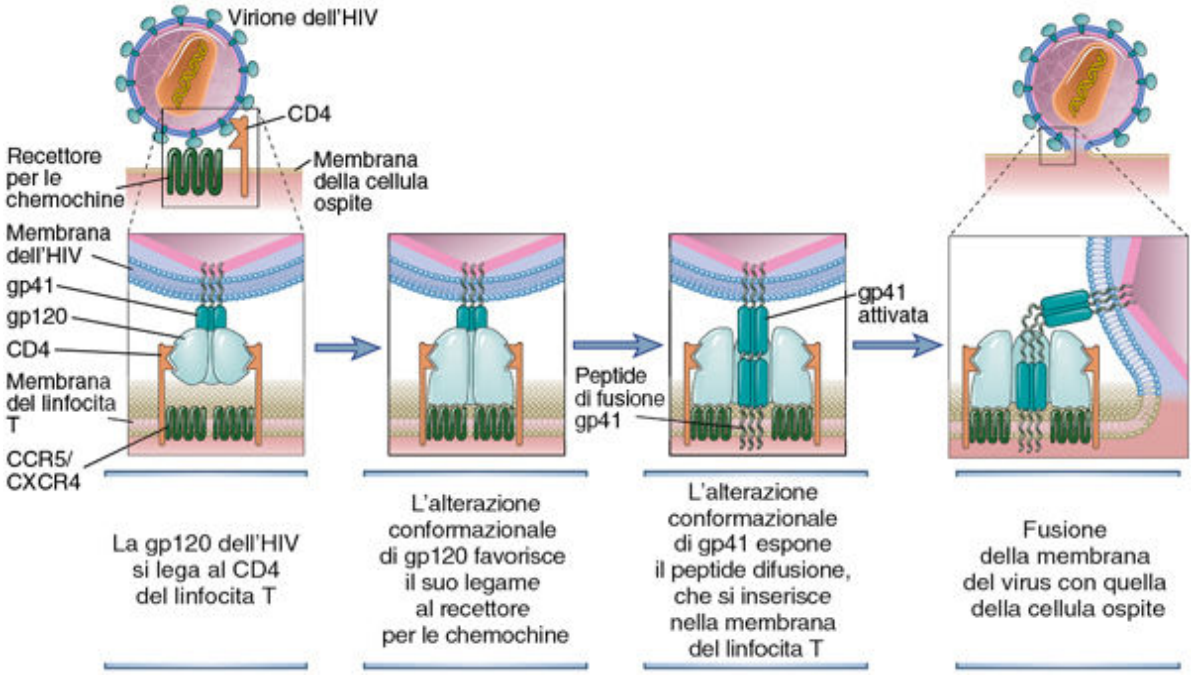


FIGURA 21-6 Meccanismo di penetrazione di HIV nella cellula bersaglio. Nel modello presentato si nota come il legame a CD4 induca modificazioni sequenziali della conformazione delle proteine gp120 e gp41. Tali modificazioni promuovono il legame del virus al corecettore (solitamente un recettore per le chemochine). Parallelamente, l'attivazione del peptide di fusione della gp41 smaschera i residui aminoacidici idrofobici che vanno a inserirsi nella membrana plasmatica della cellula ospite. Tutto ciò favorisce la fusione della membrana dell'HIV-1 con quella della cellula bersaglio.

I più importanti recettori per le chemochine che agiscono da corecettori per HIV sono CXCR4 e CCR5. Comunque, più di sette differenti recettori per le chemochine hanno dimostrato di agire da corecettori per l'ingresso dell'HIV nella cellula bersaglio. Inoltre, le proteine appartenenti alla famiglia dei recettori a sette α-eliche accoppiati a proteine G (come il recettore per il leucotriene B_4) possono contribuire all'infezione da parte dell'HIV. La specificità che i diversi ceppi virali mostrano per i diversi corecettori è basata sull'espressione di diversi recettori per le chemochine su tali cellule.

Tutti i ceppi di HIV possono infettare e replicarsi in linfociti T $CD4^+$ isolati dal sangue periferico e attivati *in vitro*. Al contrario, alcuni ceppi virali infettano le colture primarie di macrofagi umani, ma non le linee di linfociti T stabilizzate (ceppi macrofago-tropici o M-tropici), altri invece infettano le linee di linfociti T ma non i macrofagi (ceppi T-tropici). Infine alcuni ceppi virali sono in grado di infettare sia le linee cellulari T sia i

macrofagi (virus a doppio tropismo). I ceppi di HIV M-tropici esprimono una gp120 che lega CCR5, classicamente espresso su macrofagi e su alcuni tipi di linfociti T della memoria. Diversamente, i virus T-tropici legano CXCR4, classicamente espresso dalle linee cellule sari di linfociti T. I ceppi di HIV che legano CXCR4, CCR5 o entrambi i recettori vengono definiti rispettivamente X4, R5 o R5X4. In molti individui sieropositivi si assiste a un cambiamento che li porta da una fase precoce della malattia, in cui producono principalmente virus M-tropici che utilizzano CCR5, a una fase tardiva, in cui invece prevale la produzione di virus T-tropici che legano CXCR4. I ceppi T-tropici tendono a essere più virulenti, presumibilmente perché causano la perdita dei linfociti T più velocemente di quanto non facciano i ceppi M-tropici. L'importanza di CCR5 nell'infezione da HIV *in vivo* è dimostrata dall'osservazione che gli individui che non esprimono tale recettore a causa di una mutazione omozigote del gene (delezione di 32 paia di basi) sono resistenti all'infezione da HIV.

Una volta che l'HIV è penetrato nella cellula, gli enzimi contenuti nel core virale si attivano avviando il ciclo biologico del virus (vedi Fig. 21-5). Il core nucleoproteico del virus si dissolve, l'enzima trascrittasi inversa trascrive l'RNA genomico in DNA a doppia elica che entra infine nel nucleo insieme all'integrasi virale che catalizza l'inserzione del DNA virale nel genoma della cellula ospite. Alcune osservazioni sperimentali indicano che questo processo può essere ulteriormente potenziato quando il linfocita T infettato subisce una simultanea stimolazione da parte degli antigeni (batteri che agiscono da superantigeni dei linfociti T). Il genoma virale integrato nella cellula ospite prende il nome di **provirus**. Esso può rimanere inattivo per mesi o anni senza essere trascritto e quindi senza produrre nuove proteine virali o virioni, permettendo all'infezione di rimanere latente.

La trascrizione dei geni del provirus è regolata dalle sequenze LTR situate a monte dei geni strutturali del virus; le citochine e altri stimoli che attivano i linfociti T e i macrofagi potenziano la trascrizione dei geni virali. Le LTR contengono sequenze per i segnali di poliadenilazione, la sequenza promotrice TATA box e i siti di legame per due fattori di trascrizione della cellula ospite: NF-κB e SP1. L'avvio della trascrizione dei geni dell'HIV nei linfociti T è subordinato all'attivazione della cellula da parte degli antigeni o delle citochine. Per esempio, gli attivatori policlonali dei linfociti T (come la fitoemagglutinina, l'IL-2, il TNF e la linfotossina)

stimolano l’espressione dei geni dell’HIV nel linfocita T, mentre l’IL-1, l’IL-3, l’IL-6, il TNF, la linfotossina, l’IFN-γ e il GM-CSF stimolano la trascrizione genica e la replicazione dell’HIV nei monociti/macrofagi. La stimolazione da parte delle citochine o del TCR porta probabilmente all’attivazione di NF-κB e al suo conseguente legame alle sequenze nelle LTR. Questi eventi sono estremamente importanti nella patogenesi dell’AIDS poiché rappresentano il meccanismo principale attraverso cui la fase di latenza dell’infezione da HIV si conclude, avviando la replicazione virale. Ne consegue che negli individui sieropositivi, le infezioni ricorrenti potenziano la replicazione virale e aumentano la diffusione dell’infezione.

La proteina Tat agisce da principale fattore transattivante dell’HIV ed è necessaria alla trascrizione dell’mRNA virale completo. In effetti, pur in presenza di tutti i segnali necessari all’attivazione della trascrizione sinora descritti, le cellule infettate riescono a sintetizzare poche copie di mRNA virale in assenza della Tat. Ciò è dovuto al fatto che la trascrizione del genoma dell’HIV da parte dell’RNA polimerasi dei mammiferi è estremamente inefficiente poiché tale complesso enzimatico tende a interrompere la sua azione prima di aver portato a termine la trascrizione completa del genoma virale, producendo così corte sequenze di mRNA non funzionali.

La proteina Tat permette alla RNA polimerasi DNA-dipendente di rimanere legata alla molecola del DNA virale abbastanza a lungo perché si completi la trascrizione e quindi si produca un mRNA virale funzionale.

Una volta prodotti, gli mRNA virali vengono tradotti in proteine che vengono assemblate a formare i virioni maturi infettanti. Le molecole di mRNA codificanti per le diverse proteine di HIV derivano da un unico trascritto dell’intero genoma virale che viene solo in seguito sottoposto a un opportuno clivaggio. Il processo di espressione dei geni dell’HIV può essere diviso in due fasi, una precoce, in cui vengono espressi i geni regolatori, e una tardiva, in cui vengono espressi i geni strutturali e viene assemblato il genoma virale completo. Nella fase precoce, il trascritto primario viene clivato in modo da ottenere brevi sequenze di mRNA (corrispondenti ai geni regolatori) che vengono trasferite dal nucleo al citoplasma dove vengono tradotte le proteine Rev, Tat e Nef. Nella fase tardiva invece vengono tradotti i trascritti virali non clivati o che hanno subito un solo evento di splicing. Vengono così prodotte le proteine strutturali del virione codificate da *env*,

gag e *pol*. La proteina Rev segna il passaggio dalla fase precoce a quella tardiva, poiché lega i trascritti virali non clivati dei geni “tardivi” e li trasporta fuori dal nucleo. La trascrizione e la traduzione del gene *pol* producono un precursore proteico che viene quindi opportunamente tagliato per generare gli enzimi virali (trascrittasi inversa, proteasi, ribonucleasi e integrasi) che, come già detto, sono essenziali per trascrivere l’RNA genomico virale in DNA e per integrarlo nella cellula infettata. Il gene *gag* codifica per una proteina di 55 kD successivamente clivata a generare i polipeptidi p24, p17 e p15 dalla proteasi virale codificata dal gene *pol*. Come già detto, i polipeptidi p24, p17 e p15 vanno a costituire il core del virus e sono quindi necessarie per il corretto assemblaggio del virione. Il prodotto del gene *env* è una glicoproteina di 160 kD (gp160), successivamente tagliata per generare gp120 e gp41. In questo caso però la proteolisi di gp160 avviene nel reticolo endoplasmatico a opera di proteasi cellulari. Ricordiamo che gp 120 e gp 41 sono implicate nel legame dell’HIV alle cellule bersaglio. I farmaci antivirali attualmente in uso per la terapia dell’AIDS comprendono gli inibitori della trascrittasi inversa, della proteasi e dell’integrasi.

Dopo la trascrizione dei geni virali e la sintesi delle relative proteine nel citoplasma, può iniziare il processo di assemblaggio dei virioni: il trascritto di RNA genomico provirale completo viene impacchettato nel complesso nucleoproteico formato dalle proteine codificate dal gene *gag* e dagli enzimi codificati dal gene *pol*, tutti necessari per il successivo ciclo di integrazione del virus. Il complesso nucleoproteico virale viene rivestito da un involucro derivato dalla membrana cellulare contenente la glicoproteina virale Env e le glicoproteine dell’ospite durante il suo rilascio da parte della cellula infettata, che avviene attraverso un processo di gemmazione. Il tasso di produzione del virus può raggiungere livelli tali da diventare incompatibile con l’integrità della membrana plasmatica e quindi con la sopravvivenza della cellula infettata (vedi più avanti).

I fattori di restrizione dell’ospite inibiscono l’infezione virale e per questo motivo diverse proteine virali si sono evolute in risposta ad essi. In certi tipi cellulari la produzione di una proteina chiamata teterin previene il rilascio del virione. Questa proteina previene il rilascio di alcuni virus, tra cui l’HIV, e l’inibizione del processo di gemmazione può essere antagonizzato da una proteina del virus HIV nota come Vpu.

Le cellule dell'ospite incorporano alcuni fattori di restrizione all'interno delle particelle virali, tra cui le proteine APOBEC3 (*Apolipoprotein B mRNA editing Enzyme Catalytic polypeptide like 3*). Queste proteine dell'ospite sono delle citidine deaminasi che interferiscono con la replicazione virale. La proteina HIV Vif aiuta le proteine APOBEC3 target nell'ubiquitizzazione e la degradazione proteasomica, promuovendo quindi la replicazione virale. A livello delle cellule infette, un altro importante fattore di restrizione è TRIM5α della famiglia Tripartite Motif (TRIM) della ligasi E3 ubiquitina. TRIM5α interagisce con le proteine del capside dell'HIV e causa lo spoglio prematuro del virus e la degradazione proteosomica del complesso trascrittasi inversa virale. Può inoltre bloccare la traslocazione nucleare dei complessi virali pre-integrazione.

Patogenesi dell'infezione da HIV e dell'AIDS

La malattia da HIV comincia con l'infezione acuta che, potendo essere controllata solo in parte dalla risposta immunitaria dell'ospite, passa a una fase di infezione cronica progressiva nei tessuti linfoidi periferici (Fig. 21-7). Tipicamente, il virus penetra attraverso le mucose epiteliali. Gli eventi che ne conseguono possono essere suddivisi in diverse fasi.

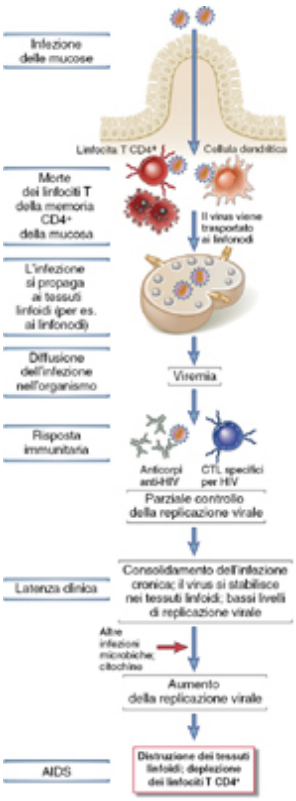


FIGURA 21-7 Progressione dell'infezione da HIV. La progressione dell'infezione da HIV si correla alla progressiva diffusione del virus dal sito di contagio ai tessuti linfoidi di tutto l'organismo. La risposta immunitaria dell'ospite può controllare l'infezione acuta solo temporaneamente, senza riuscire a impedire l'instaurarsi di un'infezione cronica nei tessuti linfoidi. Le citochine prodotte nel corso di infezioni da parte di altri microrganismi potenziano la replicazione dell'HIV, favorendo la progressione dell'infezione fino allo stadio di AIDS conclamato.

L'infezione acuta (precoce) è accompagnata dall'infezione dei linfociti T CD4$^+$ della memoria (che esprimono CCR5) dei tessuti linfoidi mucosali e dalla morte di queste cellule. Le mucose rappresentano il principale sito di localizzazione dei linfociti T della memoria, contenendo la più importante riserva di queste cellule dell'organismo, e per questo motivo la perdita di linfociti T a livello delle mucose, per quanto locale, si riflette in una considerevole diminuzione dei linfociti T a livello sistemico. Infatti, entro 2 settimane dal contagio si può assistere alla perdita della maggior parte dei linfociti TCD4$^+$.

Il passaggio dalla fase acuta a quella cronica è caratterizzato da viremia, disseminazione del virus e sviluppo della risposta immunitaria da parte dell'ospite. Le cellule dendritiche degli epiteli dove è penetrato il virus catturano il virus e quindi migrano ai linfonodi. In effetti, sulla superficie

delle cellule dendritiche è espressa una proteina con un dominio lectinico che lega il mannosio, nota comeDC-SIGN, che è in grado di interagire con l'involucro dell'HIV e di trasportare il virus. Una volta raggiunti i tessuti linfoidi, le cellule dendritiche possono trasferire il virus ai linfociti T $CD4^+$ tramite un contatto diretto cellula-cellula. Già entro pochi giorni dal contagio, nei linfonodi è rilevabile la replicazione virale. Tale replicazione causa la viremia, durante la quale un elevato numero di virioni entra in circolo. Ciò si accompagna alla cosiddetta sindrome acuta da HIV, caratterizzata da una serie di sintomi aspecifici comuni a molte altre malattie virali (vedi più avanti). La viremia favorisce la disseminazione sistemica del virus, permettendogli di infettare i linfociti T helper, i macrofagi e le cellule dendritiche dei tessuti linfoidi periferici. Il sistema immunitario reagisce alla disseminazione del virus con risposte umorali e cellulo-mediate dirette contro gli antigeni virali, che verranno descritte più avanti. Tali risposte riescono però a controllare solo parzialmente l'infezione e la replicazione virale, come attestato dall'evidenza che a circa 12 settimane dal contagio la viremia diminuisce, pur rimanendo ancora rilevabile.

Nella fase cronica della malattia, nei linfonodi e nella milza si assiste a una continua replicazione virale e alla morte cellulare (Fig. 21-7). Durante questa fase, il sistema immunitario dell'ospite riesce ancora a contrastare eventuali infezioni opportunistiche, prevenendone efficacemente le relative manifestazioni cliniche. Questo è il motivo per cui questa fase dell'infezione da HIV è definita *fase di latenza clinica*. Nonostante in questa fase la maggior parte dei linfociti T periferici non sia infettata, continua purtroppo ad aumentare stabilmente la delezione dei linfociti T $CD4^+$ dei tessuti linfoidi e ciò si riflette in un costante declino del numero di linfociti T $CD4^+$ circolanti (Fig. 21-8). Più del 90% dei 10^{12} linfociti T di tutto l'organismo risiede nei tessuti linfoidi periferici e mucosali, e si stima che l'HIV distrugga ogni giorno circa 1-2× 10^9 linfociti T $CD4^+$. Nelle fasi iniziali della malattia l'organismo è ancora in grado di produrre nuovi linfociti T $CD4^+$, rimpiazzandoli con una velocità quasi pari a quella con cui vengono uccisi. Sempre in questa fase, fino al 10% dei linfociti T $CD4^+$ negli organi linfoidi risulta infettato, mentre il numero di quelli circolanti infettati può essere inferiore allo 0,1%. Il risultato del protrarsi per diversi anni dei continui cicli di infezione virale, morte cellulare e nuove infezioni porta a un

significativo declino nel numero di linfociti T $CD4^+$ sia nei tessuti linfoidi sia in circolo.

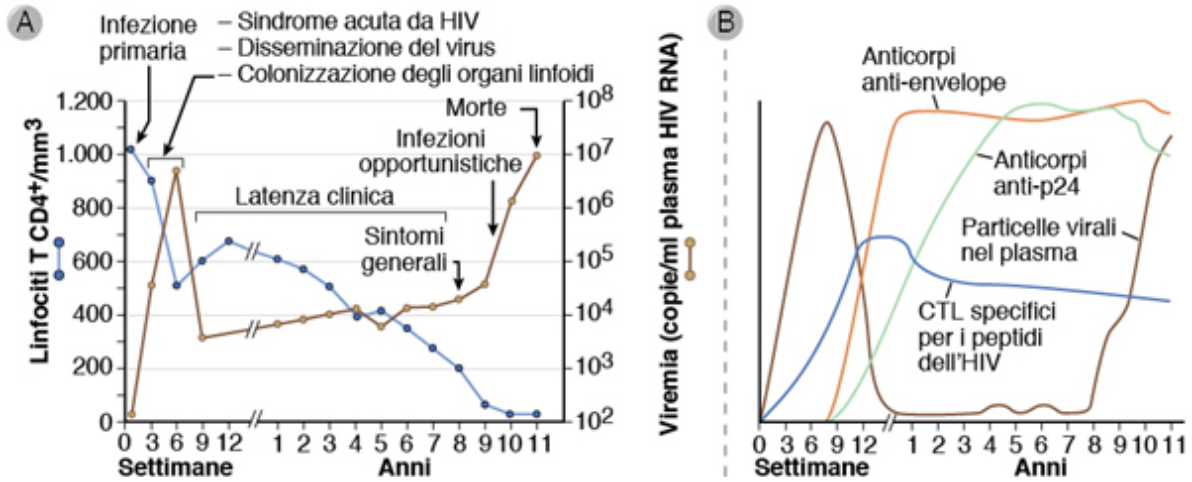


FIGURA 21-8 Decorso clinico dell'infezione da HIV. A. Livelli di viremia plasmatica, numero di linfociti T $CD4^+$ circolanti e stadi clinici della malattia. Dopo circa 12 settimane dal contagio, la viremia plasmatica si riduce a livelli molto bassi (rilevabili solo mediante saggio PCR per la trascrittasi inversa) e può rimanere stabile per molti anni. Ciononostante, il numero di linfociti T $CD4^+$ si riduce costantemente durante questa fase di latenza clinica, a causa dell'attiva replicazione virale e della continua infezione di nuovi linfociti T nei linfonodi. Quando il numero di queste cellule nel sangue scende al di sotto di una soglia critica (circa 200/mm^3), aumenta vertiginosamente il rischio di infezione da parte di altri microrganismi e dell'insorgenza di altre patologie associate all'AIDS. **B.** Risposta immunitaria all'infezione da HIV. Una risposta CTL comincia a evidenziarsi circa 2-3 settimane dopo il contagio, raggiungendo l'acme attorno alle 9-12 settimane. Durante questo periodo si assiste a una spiccata espansione dei cloni di linfociti T $CD8^+$ specifici per il virus che, alla 12^a settimana, li porta a rappresentare fino al 10% del numero totale dei CTL del paziente. Anche la risposta umorale all'HIV raggiunge l'acme attorno alla 12^a settimana. (***A,*** *Riprodotta da Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS: New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. New England Journal of Medicine 328:327-335, 1993. Copyright © 1993 Massachusetts Medical Society. Tutti i diritti riservati.*)

Aspetti dell'immunodeficienza causata dall'HIV

L'infezione da HIV conduce alla completa perdita della funzione sia del compartimento innato sia di quello specifico dell'immunità. Le alterazioni più evidenti si manifestano a carico dell'immunità cellulo-mediata e possono essere causate da diversi meccanismi, inclusi un effetto citopatico diretto del virus e diversi altri effetti indiretti. Sembra che questi effetti indiretti siano di particolare rilevanza nella patogenesi dell'infezione da HIV perché molti, se

non la maggior parte, dei linfociti T potrebbero essere infettati in maniera abortiva, così da eliminare la produzione virale e qualsiasi effetto citopatico diretto.

Nei pazienti sieropositivi, un'importante causa della diminuzione dei linfociti T CD4$^+$ è l'effetto diretto esercitato su queste cellule dall'HIV. La morte dei linfociti T CD4$^+$ infetti si associa alla produzione di virioni e rappresenta la principale causa della loro diminuzione, soprattutto nella fase acuta dell'infezione. Sono stati descritti diversi effetti tossici indotti direttamente dall'HIV nei linfociti T CD4$^+$ infettati.

- Il processo di produzione del virus, con la conseguente espressione della proteina gp41 e la gemmazione dei virioni, può aumentare la permeabilità della membrana plasmatica della cellula infetta. Ciò può determinare l'ingresso di ioni calcio a concentrazioni letali, in quanto in grado di indurre apoptosi o lisi osmotica conseguente all'entrata di acqua.
- La replicazione virale può interferire con la normale sintesi proteica della cellula, portandola alla morte.
- L'infezione da HIV non-citopatica (abortiva) attiva la via dell'inflammasoma e porta a una forma di morte cellulare chiamata piroptosi. Durante questo processo, il rilascio delle chitochine infiammatorie e dei contenuti cellulari determinano il reclutamento di nuove cellule e aumentano il numero di cellule che possono essere infettate. Questa forma di morte cellulare sembrerebbe svolgere un ruolo importante non solo nella morte delle cellule infettate, ma anche nella diffusione dell'infezione.
- La membrana plasmatica delle cellule infettate si può fondere con quella di linfociti T CD4$^+$ non infettati attraverso l'interazione tra gp 120 e CD4, formando cellule giganti plurinucleate, chiamate sincizi. La formazione del sincizio può essere letale sia per i linfociti T infettati dall'HIV sia per quelli non infettati che vi partecipano. Comunque, per quanto ben documentato *in vitro*, questo fenomeno è difficilmente osservabile nei tessuti dei pazienti affetti da AIDS.

Oltre alla morte dei linfociti T CD4$^+$ infettati dal virus, sono stati proposti meccanismi alternativi per spiegare la deplezione e il deficit funzionale di

queste cellule negli individui sieropositivi. Uno di questi è correlato all'attivazione cronica delle cellule non infettate dall'HIV ma che rispondono alle ricorrenti infezioni microbiche che affliggono i pazienti sieropositivi, fenomeno questo che porta alla produzione di grandi quantità di citochine. L'attivazione cronica e la conseguente produzione di citochine predispongono i linfociti Tnon infettati all'apoptosi. I meccanismi molecolari coinvolti in questo particolare tipo di apoptosi non sono ancora stati chiariti. L'apoptosi dei linfociti attivati potrebbe spiegare l'osservazione che il numero di linfociti T che muoiono nel corso dell'infezione è di gran lunga maggiore rispetto al numero di cellule infettate dal virus. Nei pazienti affetti da AIDS sono presenti CTL specifici per l'HIV in grado di uccidere i linfociti T $CD4^+$ infettati. Inoltre, gli anticorpi diretti contro le proteine dell'envelope virale possono opsonizzare i linfociti T $CD4^+$ infettati, che diventano così bersagli per la citotossicità anticorpo-dipendente. A livello intracellulare, il legame delle molecole gp 120 e CD4 neosintetizzate può interferire con il normale processamento delle proteine nel reticolo endoplasmatico, bloccando l'esposizione di CD4 sulla superficie cellulare. Ciò impedisce alle cellule di rispondere alla stimolazione antigenica. È stato anche proposto che la maturazione dei linfociti T $CD4^+$ nel timo possa essere difettiva nei soggetti infetti. Rimane comunque da dimostrare il reale impatto che i meccanismi indiretti sopra descritti hanno sul declino dei linfociti T $CD4^+$ nei pazienti sieropositivi.

Nei pazienti sieropositivi sono dimostrabili diversi deficit della funzione immunitaria che si sommano al deficit causato direttamente dalla diminuzione del numero di linfociti T CD4$^+$. Tra questi ricordiamo il deficit di risposta dei linfociti T agli antigeni e una risposta immunitaria umorale debole nonostante i livelli di Ig possano anche rimanere elevati. Questi deficit potrebbero tutti dipendere dall'effetto diretto dell'infezione da HIV sui linfociti T $CD4^+$. Per esempio, la forma solubile di gp 120 rilasciata dalle cellule infettate può legarsi alle cellule non infettate. In queste condizioni, i CD4 occupati dalle gp 120 non risultano più disponibili all'interazione con le molecole MHC di classe II delle APC, con conseguente compromissione delle risposte dei linfociti T helper agli antigeni. Alternativamente, il legame di gp 120 a CD4 può trasdurre segnali che modulano negativamente la funzione dei linfociti T helper. I linfociti T infettati non sono più in grado di

formare strette sinapsi immunitarie con le APC e anche questo potrebbe interferire con la loro attivazione. Alcuni studi hanno dimostrato che i pazienti sieropositivi possiedono un numero di linfociti T regolatori $CD4^+$ $CD25^+$ aumentato, ma il reale contributo di tali cellule all'immunodeficienza non è stato dimostrato.

Anche la proteina Tat può contribuire ai meccanismi patogenetici dell'immunodeficienza da HIV. Infatti, all'interno dei linfociti T, essa può interagire con numerose proteine regolatorie (come per esempio il coattivatore della trascrizione p300), interferendo con le normali funzioni dei linfociti T (come per esempio la sintesi delle citochine). Inoltre, la proteina Tat non solo è in grado di entrare nel nucleo dei linfociti T infettati latentemente (attivando la trascrizione del genoma virale), ma può anche essere rilasciata dalle cellule infettate e penetrare nelle cellule vicine, interferendo con la funzionalità dei linfociti T non infettati in maniera paracrina.

I macrofagi, le cellule dendritiche e le cellule dendritiche follicolari sono infettati o danneggiati dall'HIV, cosicché le loro alterazioni contribuiscono all'immunodeficienza nell'infezione da HIV.

- I macrofagi esprimono CD4 a livelli molto più bassi rispetto ai linfociti T helper ma, esprimendo comunque CCR5, mantengono la suscettibilità all'infezione da HIV. Comunque, essi risultano relativamente resistenti agli effetti citopatici dell'HIV. I macrofagi possono essere infettati anche in modo indipendente da gp120/gp41, per esempio fagocitando le cellule infettate o endocitando in modo Fc-dipendente i virioni opsonizzati dagli anticorpi. I macrofagi infettati dall'HIV sono relativamente resistenti agli effetti citopatici di HIV e per questo motivo possono rappresentare un importante serbatoio del virus, come dimostrato dal fatto che in molti tessuti di pazienti affetti da AIDS (inclusi il cervello e i polmoni) la quantità di virus associata ai macrofagi supera quella associata ai linfociti. Infine, va notato che nei macrofagi infettati dall'HIV potrebbero risultare alterate sia la funzione di presentazione dell'antigene sia la produzione di citochine.
- Anche le cellule dendritiche possono essere infettate dall'HIV. Anche in queste cellule, come già descritto per i macrofagi, l'HIV non provoca un danno diretto significativo. Durante il processo di presentazione

dell’antigene, le cellule dendritiche infettate instaurano tuttavia forti contatti con i linfociti T naïve. È stato proposto che le cellule dendritiche infettino i linfociti T naïve durante questi contatti, e che questo possa essere una via per la diffusione dell’infezione.

- Le cellule dendritiche follicolari (*Follicular Dendritic Cells*, FDC) presenti nella milza e nei centri germinativi dei linfonodi intrappolano grandi quantità di virus sulla loro superficie, soprattutto legando i virioni opsonizzati dagli anticorpi attraverso il recettore per il frammento Fc. Le FDC non vengono infettate dall’HIV con elevata efficienza, ma contribuiscono alla patogenesi dell’immunodeficienza attraverso due importanti meccanismi: innanzitutto, sulla loro superficie si accumula un’elevata quantità di HIV che può infettare con maggiore efficacia i macrofagi e i linfociti T $CD4^+$ nel linfonodo. Inoltre, le normali funzioni immunitarie svolte dalle FDC risultano alterate. Bisogna comunque ammettere che anche le FDC vengono uccise dal virus. Sebbene i meccanismi di questa citotossicità non siano stati chiariti, il risultato della perdita della rete di FDC nel linfonodo e nella milza comporta un drammatico sovvertimento della normale architettura funzionale di questi due organi linfoidi periferici.

Serbatoi di HIV e turnover virale

L’HIV presente nel sangue dei pazienti è in gran parte prodotto dai linfociti T $CD4^+$ infettati a breve emivita e in quantità molto minore da altre cellule. Nei pazienti trattati con farmaci antiretrovirali è possibile prevedere attraverso modelli matematici (e osservare effettivamente) tre distinte fasi di calo dellaviremia. Queste curve di decadimento sono state utilizzate per dedurre la distribuzione dell’HIV nei differenti serbatoi cellulari. Si ritiene che più del 90% del virus plasmatico sia prodotto dai linfociti T $CD4^+$ infettati a breve emivita (circa 1 giorno). Molto probabilmente tali cellule corrispondono a linfociti T $CD4^+$ attivati, che rappresentano la principale riserva e sorgente di virus nei pazienti infettati. Circa il 5% del virus plasmatico è invece prodotto dai macrofagi dotati di un’emivita più lunga (circa 2 settimane). Si ipotizza infine che una piccola frazione di virus, probabilmente non superiore all’1%, sia presente nei linfociti T della memoria infettati in modo latente. A causa della loro lunga

emivita, anche se fosse possibile bloccare farmacologicamente tutti i nuovi cicli di infezione di queste cellule, occorrerebbero anni per eradicare completamente il virus da quest'ultimo serbatoio.

Quadro clinico dell'AIDS

Oggi siamo in possesso di una grossa mole di informazioni riguardo all'epidemiologia e al decorso clinico dell'infezione da HIV. Con lo sviluppo di nuove e più efficaci terapie antiretrovirali, molte di queste manifestazioni cliniche vanno modificandosi. Nel prossimo paragrafo descriveremo le classiche manifestazioni dell'infezione da HIV e faremo riferimento alle loro principali modificazioni, quando sono rilevanti.

Trasmissione dell'HIV ed epidemiologia dell'AIDS

L'HIV si trasmette da un individuo a un altro essenzialmente attraverso tre vie.

- ***Il contatto sessuale, che rappresenta la modalità più frequente di trasmissione***, sia tra coppie eterosessuali (modalità di trasmissione più frequente in Africa e in Asia) sia tra omosessuali maschi. Nell'Africa subsahariana, dove il tasso di infezione è il più alto nel mondo (stimato attorno a 10.000 nuovi casi ogni giorno), più della metà degli individui infettati sono donne.
- ***La trasmissione da madre a figlio*** è responsabile della maggior parte dei casi pediatrici di AIDS. La trasmissione avviene con maggiore frequenza in utero o durante il parto, sebbene sia teoricamente possibile anche la trasmissione attraverso il latte materno.
- ***L'inoculo di sangue o di derivati ematici infetti è un altro importante meccanismo di trasmissione di HIV***. La maggior parte dei casi di contagio attraverso questa via è rappresentata dallo scambio di siringhe tra tossicodipendenti. Invece, i casi di individui che contraggono l'AIDS a seguito di trasfusioni di emoderivati sono drasticamente diminuiti dopo l'introduzione degli screening routinari dei donatori di sangue e dei derivati destinati alle trasfusioni.

Decorso clinico dell'infezione da HIV

Il decorso dell'infezione può essere seguito misurando la quantità di virus e il numero di linfociti T $CD4^+$ periferici (vedi Fig. 21-8).

- La ***fase acuta*** della malattia, definita anche *sindrome acuta da HIV*, è un periodo di intensaviremia caratterizzato da sintomi aspecifici dell'infezione. Essa si sviluppa nel 50-70% degli adulti infettati tipicamente da 3 a 6 settimane dopo il contagio. Si possono osservare un picco di viremia e una minima riduzione della conta dei linfociti T $CD4^+$, che però rientra molto frequentemente nei limiti fisiologici. In molti pazienti comunque non si osservano sintomi e l'infezione rimane occulta.
- La ***fase cronica di latenza clinica*** può durare diversi anni. Durante tale periodo, il virus rimane contenuto principalmente nei tessuti linfoidi e la perdita di linfociti T $CD4^+$ è corretta dalla compensazione operata da parte dei progenitori. I pazienti rimangono asintomatici o soffrono solo per piccole infezioni. Entro un periodo variabile tra i 2 e 6 mesi dal contagio, la concentrazione plasmatica del virus si stabilizza a un particolare set-point, diverso da paziente a paziente. Tale set-point e il numero di linfociti T $CD4^+$ plasmatici sono importanti indicatori prognostici della malattia. Al progredire di questa, il paziente diventa suscettibile alle infezioni da parte di altri microrganismi e le conseguenti risposte infiammatorie/immunitarie possono stimolare la replicazione dell'HIV accelerando la distruzione dei tessuti linfoidi. Ricordiamo a questo riguardo che la replicazione dell'HIV è potenziata da stimoli che attivano i linfociti T, come gli antigeni e una varietà di citochine. Alcune di queste (come il TNF, prodotto durante la risposta immunitaria innata alle infezioni microbiche) sono particolarmente potenti nell'accelerare la produzione di HIV. Così, nel tentativo di eradicare altri microrganismi patogeni, il sistema immunitario accelera la propria distruzione a opera dell'HIV.
- ***L'infezione da parte di HIV progredisce alla fase finale, almeno nel passato, quasi inevitabilmente fatale, chiamata AIDS: a questo stadio la distruzione dei tessuti linfoidi secondari è quasi completa e il numero di linfociti T $CD4^+$ circolanti scende sotto la soglia di 200 cellule/mm^3***. In questa fase la viremia può nuovamente tornare a impennarsi poiché la replicazione del virus nei suoi serbatoi diversi dai

linfonodi può accelerare in maniera incontrollata. I pazienti affetti da AIDS presentano un quadro clinico articolato ed estremamente eterogeneo che può comprendere infezioni opportunistiche, neoplasie, cachessia (sindrome da deperimento), insufficienza renale (nefropatia da HIV), degenerazione del sistema nervoso centrale (encefalopatia dell'AIDS) (Tab. 21-7). La suscettibilità alle infezioni dei pazienti affetti da AIDS è principalmente dovuta al fatto che i linfociti T helper $CD4^+$ svolgono un ruolo essenziale sia nella risposta immunitaria umorale sia in quella cellulo-mediata dirette contro i diversi microrganismi. Inoltre, molti tumori che si sviluppano nei pazienti affetti da AIDS hanno un'eziologia virale che riflette l'incapacità degli individui sieropositivi di organizzare una risposta immunitaria efficiente contro i virus oncogeni. La maggior parte delle infezioni opportunistiche e dei tumori associati all'AIDS non si manifesta fino a quando il numero dei linfociti T $CD4^+$ non scende al di sotto della soglia di 200 cellule/mm^3. Non sono ancora stati chiariti i meccanismi alla base della cachessia e della degenerazione del sistema nervoso centrale associate all'AIDS. La prima la si osserva spesso in pazienti sieropositivi che hanno sviluppato malattie infiammatorie croniche e rispecchia probabilmente la duplice azione delle citochine proinfiammatorie (come il TNF) sull'appetito e sul metabolismo. Le degenerazioni del sistema nervoso centrale nell'AIDS possono essere causate dal danno neuronale indotto direttamente dal virus oppure dall'azione di proteine virali liberate dalle cellule infettate (tra le quali gp120 e Tat) oppure ancora dall'azione di citochine prodotte dalle cellule della microglia infettate. Molte di queste devastanti conseguenze dell'infezione da HIV, come le infezioni opportunistiche e i tumori, sono state notevolmente ridotte con l'introduzione della terapia antiretrovirale altamente attiva.

TABELLA 21-7 Caratteristiche cliniche dell'infezione da HIV

Fase della malattia	Caratteristiche cliniche
Sindrome acuta	Febbre, cefalea, mal di gola con faringite, linfoadenopatia generalizzata, eruzioni cutanee
Periodo di latenza clinica	Diminuzione del numero di linfociti T $CD4^+$

AIDS	Infezioni opportunistiche Protozoi *(Toxoplasma, Cryptosporidium)* Batteri *(Mycobacterium avium, Nocardia, Salmonella)* Funghi *(Candida, Cryptococcus neoformans, Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum, Pneumocystis)* Virus (citomegalovirus, herpes simplex, varicella-zoster) Tumori Linfomi (compresi i linfomi B associati a infezione da virus di Epstein-Barr) Sarcoma di Kaposi Carcinoma della cervice Encefalopatia Sindrome da deperimento

Per quanto questa descrizione del decorso clinico si applichi alla maggior parte dei casi più gravi di AIDS, la velocità con cui la malattia può progredire è altamente variabile e addirittura alcuni individui rientrano nella categoria dei cosiddetti *long-term non progressor*. Le componenti immunitarie che si correlano alla variabilità della progressione della malattia rimangono sconosciute. Bisogna infine tenere conto del fatto che le più recenti terapie antiretrovirali altamente attive hanno radicalmente modificato il corso della malattia e ridotto sensibilmente l'incidenza delle più gravi infezioni opportunistiche (per esempio da *Pneumocystis* spp.) e dei tumori (per esempio il sarcoma di Kaposi).

Risposta immunitaria all'HIV

A seguito dell'infezione si attivano sia la risposta umorale sia quella cellulo-mediata dirette contro l'HIV, ma esse possono garantire solo una limitata protezione contro il virus. Nelle sue fasi precoci, la risposta immunitaria contro l'HIV è per molti aspetti simile alle risposte immunitarie verso altri virus ed è efficace nell'eliminare la maggior parte dei virioni presenti nel sangue e nei linfociti T. Tali risposte non riescono tuttavia a eradicare completamente il virus la cui infezione, progredendo, annulla le difese immunitarie nella maggior parte dei pazienti. Nonostante le risposte immunitarie contro l'HIV siano di scarsa efficacia, è importante puntualizzare almeno tre aspetti: 1) come già menzionato, le risposte immunitarie contro l'HIV possono rivelarsi addirittura dannose per l'ospite,

per esempio per l'azione dei CTL $CD8^+$ che eliminano i linfociti T $CD4^+$, i quali esprimono antigeni virali, oppure cellule non infettate che si infettano nell'atto di captare i virioni opsonizzati attraverso l'endocitosi mediata dal recettore per l'Fc; 2) gli anticorpi diretti contro l'HIV prodotti durante la risposta immunitaria rappresentano utili marcatori ampiamente usati per la diagnosi dell'infezione; 3) la messa a punto di un vaccino efficace contro l'HIV non può prescindere dalla conoscenza del tipo di risposte immunitarie verosimilmente più protettive (i cosiddetti *correlati di protezione*).

Sono state sinora descritte molte risposte immunitarie innate contro l'HIV, tra le quali vi sono la produzione di peptidi antimicrobici (defensine), e l'attivazione delle cellule NK, le cellule dendritiche (in particolare quelle plasmocitoidi che producono l'IFN di tipo I) e il sistema del complemento. I ruoli di queste risposte nel combattere l'infezione non sono comunque stati definiti.

La prima risposta immunitaria specifica contro l'HIV è caratterizzata da un'imponente espansione dei linfociti T $CD8^+$ specifici per peptidi dell'HIV. Durante le fasi precoci dell'infezione i linfociti $CD8^+$ circolanti specifici per l'HIV possono espandersi al punto da arrivare a rappresentare fino al 10% (o anche più) dell'intera popolazione di queste cellule. Questi CTL riescono a controllare l'infezione nella fase acuta (vedi Fig. 21-8), ma in definitiva si dimostrano inefficienti soprattutto a causa dell'insorgere di ceppi mutanti del virus che sfuggono alla risposta immunitaria. Anche i linfociti T $CD4^+$ possono rispondere al virus e prendere anche parte all'azione di controllo del virus con diverse modalità. Un'attiva risposta dei linfociti T $CD4^+$ è necessaria al fine di favorire la formazione di linfociti T della memoria $CD8^+$; tuttavia, anche i linfociti $CD4^+$ sono in grado di attivare una risposta citotossica contro le cellule infettate dall'HIV, probabilmente attraverso l'espressione del ligando di Fas che è in grado di attivare Fas sui linfociti $CD4^+$ infettati dal virus.

L'importanza della risposta citotossica nel controllo dell'infezione da HIV è sottolineata dall'evoluzione del virus per effetto della pressione immunologica, che dà origine a isolati virali che hanno perso gli epitopi precedentemente reattivi con le cellule citotossiche. L'evoluzione del virus comporta anche la perdita degli epitopi riconosciuti dai linfociti $CD4^+$,

suggerendo che sia i linfociti CD4 sia i CD8 contribuiscano alla difesa dell'ospite contro il virus.

Nel periodo compreso tra le 6 e le 9 settimane dal contagio, si possono riscontrare risposte anticorpali dirette contro una varietà di antigeni virali. Le strutture dell'HIV maggiormente immunogene (e quindi in grado di stimolare una risposta anticorpale), sembrano essere le glicoproteine dell'envelope ed effettivamente nel siero dei pazienti sieropositivi si possono riscontrare titoli elevati di anticorpi anti-gp120 e anti-gp41. Altri anticorpi spesso riscontrabili sono quelli diretti contro la p24, la trascrittasi inversa e i prodotti dei geni *gag* e *pol* (vedi Fig. 20-8). L'effetto di questi anticorpi sul decorso clinico dell'infezione da HIV è incerto. Gli anticorpi prodotti precocemente non sono neutralizzanti e generalmente inibiscono solo debolmente l'infettività virale e gli effetti citopatici. Gli anticorpi neutralizzanti anti-gp120 si sviluppano solo 3 mesi dopo il contagio, ma perfino tali anticorpi non possono controllare un virus che nel frattempo ha modificato gli epitopi immunodominanti delle glicoproteine dell'envelope. Il sequenziamento dei geni codificanti per la catena leggera e pesante degli anticorpi specifici per gp140 in soggetti sieropositivi da pochi anni ha rivelato la presenza di anticorpi ampiamente neutralizzanti. Questi anticorpi si legano a un sito di una proteina virale che il virus non può permettersi di mutare, per esempio il sito di legame di gp140 per CD4. Si tratta quindi di anticorpi efficaci per l'eliminazione del virus. Una caratteristica sorprendente di questi anticorpi è che essi sono stati selezionati dopo un'ipermutazione somatica estesa, che implica le risposte dei linfociti T helper. Di conseguenza, il repertorio iniziale di linfociti B naïve specifico per l'HIV è composto da linfociti B i cui recettori per l'antigene legano debolmente certi epitopi antigenici come il sito di legame di gp140 per CD4. È possibile che dopo parecchie ipermutazioni somatiche e diversi processi di selezione, che si possono realizzare in un'infezione di lungo corso, si generino popolazioni di linfociti B che leghino con alta affinità gli epitopi che inizialmente era riconosciuti debolmente. Uno degli obiettivi della vaccinazione è la generazione di tali anticorpi neutralizzanti ad ampio spettro e ad alta affinità, ma fino a oggi le sperimentazioni non hanno dati risultati consistenti.

Meccanismi di elusione immunitaria da parte dell'HIV

L’HIV è il prototipo del patogeno che evade le difese dell’ospite distruggendo il sistema immunitario. Inoltre, varie caratteristiche consentono all’HIV di sottrarsi alle risposte effettrici dell’ospite.

L’HIV è caratterizzato da un tasso di mutazione estremamente elevato a causa della scarsa precisione della trascrittasi inversa. In questo modo esso può sfuggire al riconoscimento da parte degli anticorpi o dei linfociti T generati contro le proteine virali prima che queste subiscano la mutazione. È stato stimato che in un individuo sieropositivo ogni giorno si verificano tutte le mutazioni puntiformi possibili del genoma virale. Una regione della molecola gp120, chiamata ansa V3, è una delle strutture antigeniche virali più variabile e differisce addirittura tra singoli isolati HIV raccolti dallo stesso individuo in momenti diversi. Anche molti epitopi virali, che potrebbero potenzialemente fungere da bersaglio per gli anticorpi neutralizzanti ad ampio spettro, sono schermati dagli ingombranti residui saccaridici *N*-linked che costituiscono il cosidetto scudo glicanico dell’HIV.

Le cellule infettate dal virus possono sfuggire all’azione dei CTL poiché sulla loro superficie l’espressione delle molecole MHC di classe I è diminuita. In effetti, la proteina Nef dell’HIV abbassa l’espressione delle molecole MHC di classe I (in particolare dell’HLA-A e dell’HLA-B) sulla superficie delle cellule infettate, principalmente favorendo la loro internalizzazione. Inoltre è stata dimostrata l’esistenza di altri meccanismi di inibizione dell’immunità cellulo-mediata. Come menzionato in precedenza, tra essi vi sono l’inibizione preferenziale delle citochine T_H1, l’attivazione dei linfociti T regolatori e la soppressione delle funzioni delle cellule dendritiche. I meccanismi di queste azioni del virus come anche il loro significato patogenetico non sono noti.

“ Elite controllers” e “ long-term non progressors”: un possibile ruolo dei geni dell’ospite

La maggior parte degli individui infettati da HIV progredisce verso l’AIDS, sebbene circa l’1% dei soggetti infettati non sviluppi la malattia. Questi individui hanno un numero elevato di linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$, non necessitano di terapia, hanno una viremia persistente nel tempo, ma non sviluppano la malattia per almeno 10-15 anni. Sulla base dei livelli di viremia, questo gruppo di individui può essere diviso in due sottogruppi: i

long-term non progressors, che hanno una viremia rilevabile (circa 5000 copie di HIV-1 RNA per millimetro cubo di sangue), e un sottogruppo molto più limitato di *elite controllers* che presentano una carica viremica di circa 50 copie, o addirittura inferiore, di HIV-1 RNA per millimetro cubo di sangue. Vi è un grande interesse nello studiare le basi genetiche del controllo dell'HIV attraverso l'esame delle coorti di questi pazienti. Sinora, gli studi di associazione genica hanno suggerito che il locus MHC potrebbe avere un ruolo importante nella protezione degli individui e nella prevenzione della progressione della malattia. Alcuni antigeni HLA di classe I e anche alcuni antigeni HLA di classe II sono stati associati all'assenza di progressione di malattia. Inoltre, abbiamo già descritto l'importanza della mutazione in omozigosi del gene *CCR5* (delezione di 32 paia di basi) nel trasmettere la protezione dall'infezione. È probabile che nei prossimi anni, saranno identificati altri fattori genetici che contribuiscono alla resistenza verso il virus.

Terapia e prevenzione dell'AIDS e prospettive di vaccinazione

Nell'ambito della ricerca scientifica, i maggiori sforzi sono stati rivolti principalmente allo sviluppo di farmaci in grado di interferire con le varie fasi del ciclo biologico dell'HIV; la terapia dell'infezione da HIV e dell'AIDS è attualmente basata sulla combinazione di tre farmaci antivirali diretti verso strutture del virus che non hanno una controparte nelle cellule umane. La prima classe di farmaci antiretrovirali utilizzata su larga scala è quella degli analoghi nucleotidici, in grado di inibire l'attività della trascrittasi inversa virale; tra questi vi sono la 3´-azido-3´-deossitimidina (AZT), gli analoghi della deossicitidina e della deossiadenosina. Quando vengono utilizzati in regime di monoterapia, questi farmaci riescono a ridurre significativamente i livelli plasmatici dell'RNA virale per parecchi mesi o anche anni, ma non riescono comunque a bloccare la progressione della malattia, principalmente a causa dell'instabilità genetica del virus che genera forme mutate di trascrittasi inversa resistenti. Gli inibitori non nucleosidici della transcrittasi inversa si legano direttamente all'enzima e ne bloccano la funzione. Più recentemente sono stati sviluppati e introdotti in terapia inibitori delle proteasi in grado di bloccare efficacemente il clivaggio dei precursori proteici virali e quindi la produzione delle proteine mature del

capside o del core dell'HIV. Anche in questo caso, quando gli inibitori delle proteasi vengono utilizzati da soli, in breve tempo si selezionano ceppi virali mutati resistenti. Per queste ragioni, gli inibitori delle proteasi vengono associati a due diversi inibitori della trascrittasi inversa. Questo nuovo approccio terapeutico basato su tre farmaci, comunemente noto come terapia antiretrovirale altamente attiva (*Highly Active Anti-Retroviral Therapy*, HAART) o terapia antiretrovirale (*Anti-Retroviral Therapy*, ART), risulta molto efficace nel ridurre la viremia plasmatica a livelli non rilevabili nella maggior parte dei pazienti trattati per anni. Anche un inibitore dell'integrasi è oggi disponibile per la terapia antivirale. I farmaci della classe degli inibitori di entrata (*entry inhibitors*) costituiscono una nuova classe di molecole che agisce prevenendo l'entrata del virus attraverso l'interazione con CD4 o CCR5 sulle cellule dell'ospite o con le proteine gp41 o gp120 sul virus. I farmaci che agiscono sulla molecola gp41 prevengono la fusione dell'envelope virale con la membrana plasmatica della cellula ospite. Nonostante in alcuni pazienti le moderne terapie antiretrovirali si siano mostrate in grado di mantenere i titoli virali al di sotto del limite di rilevazione fino a dieci anni, è improbabile che esse riescano a eradicare il virus da tutte le sue riserve (specialmente quelle rappresentate da cellule a lunga sopravvivenza) e non si può escludere che, qualora venga utilizzata per lunghi periodi di tempo, anche verso la HAART si possano sviluppare resistenze. Altri importanti problemi annessi a queste nuove terapie e che rendono impossibile il loro utilizzo su larga scala in molte parti del mondo sono i costi elevati, una complessa posologia e i gravi effetti collaterali.

Le infezioni opportunistiche contratte dai pazienti affetti da AIDS vengono trattate con la necessaria profilassi, con antibiotici e opportune misure di supporto. Per essere efficace, in questi pazienti la terapia antibiotica deve essere solitamente più aggressiva rispetto a quella somministrata a ospiti immunocompetenti.

Gli sforzi volti alla prevenzione dell'infezione da HIV sono estremamente importanti e potenzialmente molto efficaci nel controllare il diffondersi dell'epidemia. Per esempio, come già detto, negli Stati Uniti lo screening routinario dei donatori di sangue e dei prodotti ematici ha già reso trascurabile il rischio di questa modalità di trasmissione. Si stanno inoltre attuando numerose campagne di sensibilizzazione all'uso del preservativo e alla riduzione dello scambio di siringhe infette tra tossicodipendenti. È

plausibile che tali campagne, volte ad aumentare la consapevolezza dei rischi associati all'AIDS, possano fornire buoni risultati nell'ambito della prevenzione. Sperimentazioni cliniche recenti hanno dimostrato che la somministrazione di farmaci antiretrovirali alle donne gravide previene l'infezione del feto. Anche l'uso profilattico di questi farmaci nei pazienti ad alto rischio riduce il tasso di infezione.

Lo sviluppo di un efficace vaccino contro l'HIV è diventato una priorità di molti istituti di ricerca biomedica in tutto il mondo. Il raggiungimento di tale obiettivo è reso difficoltoso dalla già citata instabilità genetica dell'HIV che lo porta a modificare la struttura di molti dei suoi potenziali antigeni immunogenici. È verosimile che un vaccino, per essere veramente efficace, debba stimolare risposte sia umorali sia cellulo-mediate verso proteine virali che svolgono un ruolo critico nel ciclo vitale dell'HIV. Per raggiungere tale scopo sono stati finora tentati diversi approcci vaccinali. La maggior parte del lavoro preliminare è stata effettuata usando come modello sperimentale l'infezione di macachi da parte del virus dell'immunodeficienza della scimmia (*Simian Immunodeficiency Virus*, SIV), contro il quale sono già stati sviluppati vaccini efficaci. Questo successo è incoraggiante visto che, dal punto di vista molecolare, SIV è strettamente correlato a HIV e da un punto di vista clinico esso causa nei macachi una malattia molto simile all'AIDS. Numerosi vaccini con virus vivi sono stati sviluppati e saggiati nella speranza di indurre una forte risposta CTL. Tra questi citiamo i virus ibridi composti in parte da sequenze del SIV e in parte da sequenze dell'HIV oppure i virus HIV attenuati mediante delezione di una o più parti del loro genoma (come per esempio la delezione del gene *nef*). Va comunque rimarcato che la vaccinazione con virus vivi presenta seri rischi legati alla possibilità che essi, se non adeguatamente attenuati o in seguito alla loro ricombinazione *in vivo* con ceppi wild-type dell'HIV, possano trasformarsi in forme virulente, contribuendo alla malattia. Un approccio alternativo per ovviare a questi rischi pur mantenendo la capacità di indurre una risposta CTL consiste nell'uso di virus vivi ricombinanti diversi dall'HIV utilizzati come "veicoli" contenenti i geni dell'HIV. Studi preliminari in volontari hanno dimostrato che un vaccino costituito dallo scheletro del virus del vaiolo dei canarini con inclusi molti geni dell'HIV-1 è effettivamente in grado di indurre una risposta immunitaria CTL diretta contro gli antigeni dell'HIV. Sono stati presi in considerazione anche molti vaccini a DNA.

Questi sono composti da una combinazione di geni strutturali e regolatori del SIV o dell'HIV inseriti in vettori di espressione a DNA di mammifero. Recentemente, i migliori risultati sono stati ottenuti utilizzando combinazioni di vaccini (per esempio un'immunizzazione iniziale con un vaccino a DNA seguita dall'ulteriore stimolo con il virus del vaiolo dei canarini). I vaccini basati su proteine ricombinanti o subunità peptidiche immunogeniche sono nella maggior parte dei casi inefficienti quando vengono utilizzati da soli, poiché gli anticorpi prodotti in risposta a questi vaccini molto spesso non riescono a neutralizzare i virioni isolati dai pazienti.

RIEPILOGO

* Le malattie da immunodeficienza sono causate da difetti congeniti o acquisiti a carico dei linfociti, dei fagociti o di altri mediatori dell'immunità innata e acquisita. Queste malattie si accompagnano ad aumentata suscettibilità alle infezioni, le cui natura e gravità dipendono principalmente da quale componente del sistema immunitario sia alterato e dal grado di tale alterazione.
* I deficit dell'immunità innata includono i difetti nella capacità dei fagociti di eliminare i microrganismi (come nella CGD o nella sindrome di Chédiak-Higashi), i difetti della capacità dei leucociti di migrare e aderire (come nel deficit di adesione leucocitaria) e i difetti della trasduzione del segnale generato dai TLR.
* Le immunodeficienze combinate gravi includono i deficit dello sviluppo linfocitario che possono interessare sia i linfociti T sia i B e sono causate da mutazioni che compromettono la maturazione dei linfociti T oppure da deficit della trasduzione del segnale generato dalle citochine, del metabolismo delle purine o del processo di ricombinazione V(D)J.
* I deficit anticorpali includono malattie causate da difetti della maturazione o dell'attivazione dei linfociti B e difetti della collaborazione tra linfociti T e B (come nella sindrome iper-IgM legata al cromosoma X).
* Le immunodeficienze dei linfociti T includono malattie causate da deficit dell'espressione delle molecole MHC, deficit della trasduzione del segnale nei linfociti T e rare malattie nelle quali sono coinvolte le funzioni dei CTL e delle cellule NK.
* La cura delle immunodeficienze congenite può essere effettuata attraverso il trasferimento passivo di anticorpi, il trapianto di midollo o di cellule staminali o la terapia sostitutiva con l'enzima deficitario. In un prossimo futuro la terapia genica potrà fornire nuove opzioni.
* Le immunodeficienze acquisite sono causate da infezioni, malnutrizione, neoplasie disseminate e dalle terapie immunosoppressive usate per prevenire il rigetto dei trapianti o per curare le malattie autoimmuni.
* L'AIDS è una grave immunodeficienza causata dall'infezione da HIV. Questo retrovirus infetta i linfociti T $CD4^+$, i macrofagi e le cellule dendritiche causando una disfunzione generalizzata del sistema immunitario specifico. L'immunodeficienza che si accompagna all'AIDS è dovuta principalmente al deficit di linfociti T $CD4^+$.

* Per entrare nelle cellule bersaglio, l'HIV si deve legare sia a CD4 sia a un corecettore appartenente alla famiglia dei recettori per le chemochine. Una volta penetrato, il genoma virale viene retrotrascritto nel DNA e incorporato nel genoma della cellula ospite. La trascrizione del genoma virale e la sua replicazione possono essere stimolate da diversi segnali che normalmente attivano la cellula ospite. La replicazione virale si accompagna alla morte delle cellule infettate.
* La fase acuta dell'infezione da HIV è caratterizzata dalla morte dei linfociti T $CD4^+$ della memoria delle mucose e dalla disseminazione del virus ai linfonodi. Nella conseguente fase di latenza, sempre nei linfonodi, si assiste a un basso ritmo di replicazione virale e a una lenta ma progressiva perdita di linfociti T. La persistente attivazione dei linfociti T promuove la loro morte portando alla loro rapida scomparsa e al deficit immunitario nella fase cronica dell'infezione.
* La diminuzione del numero dei linfociti T $CD4^+$ nei soggetti sieropositivi è dovuta agli effetti citopatici esercitati direttamente dal virus, agli effetti tossici esercitati dalle proteine virali (come gp120 non incorporata nei virioni ma rilasciata in soluzione) e agli effetti indiretti (come l'apoptosi indotta dall'attivazione o dall'uccisione dei linfociti T $CD4^+$ infettati da parte dei CTL).
* Nei pazienti sieropositivi esistono molti serbatoi di HIV, come i linfociti T $CD4^+$ attivati a breve emivita, i macrofagi a lunga emivita e i linfociti T quiescenti infettati in modo latente, caratterizzati da un'emivita molto lunga.
* La progressiva diminuzione del numero dei linfociti T $CD4^+$ causata dall'HIV si manifesta come un forte incremento della suscettibilità alle infezioni da parte di un'ampia gamma di agenti opportunistici. Inoltre, i pazienti sieropositivi mostrano un aumento dell'incidenza di particolari forme di tumori, come il sarcoma di Kaposi e i linfomi a cellule B associati all'infezione da EBV ed encefalopatia. L'incidenza di queste complicanze si è notevolmente ridotta dopo l'introduzione della terapia antiretrovirale.
* L'HIV è estremamente instabile da un punto di vista genetico, mostrando un alto tasso di mutazioni che gli consente di sottrarsi alla risposta immunitaria dell'ospite nonché alle terapie farmacologiche. La variabilità genetica dell'HIV pone anche seri problemi alla realizzazione di un vaccino. A oggi, l'infezione da HIV può essere curata con una combinazione di inibitori degli enzimi virali necessari al ciclo biologico del virus.

LETTURE CONSIGLIATE

Immunodeficienze congenite (primarie)

Blackburn M.R.; Kellems R.E: Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. *Advances in Immunology* 86:1–4 (2005).

Casanova J.-L.; Abel L: The genetic theory of infectious diseases: a brief history and selected illustrations. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 14:215–243 (2013).

Castigli E.; Geha R.S: Molecular basis of common variable immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117:740–746 (2006).

Chen X.; Jensen P.E: MHC class II antigen presentation and immunological abnormalities due to deficiency of MHC class II and its associated genes. *Experimental and Molecular Pathology*

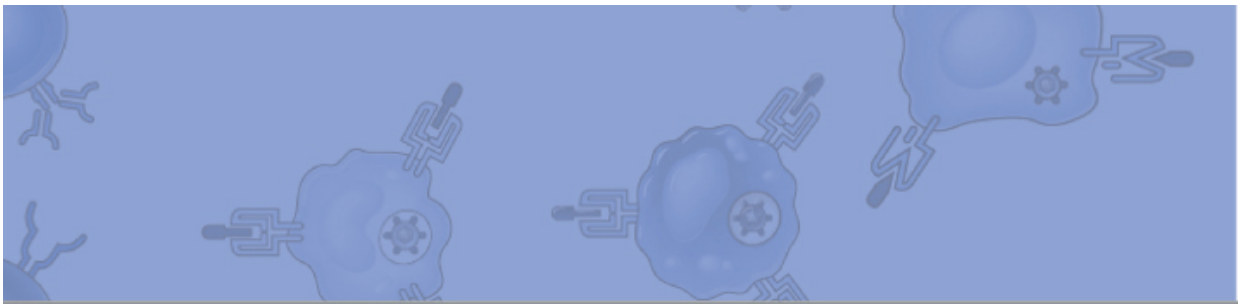
85:40–44 (2008).
Conley M.E.; Dobbs A.K.; Farmer D.M.; Kilic S.; Paris K.; Grigoriadou S.; Coustan-Smith E.; Howard V.; Campana D: Primary B cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts. *Annual Review of Immunology* 27:199–227 (2009).
Durandy A.; Kracker S.; Fischer A: Primary antibody deficiencies. *Nature Reviews Immunology* 13:519–533 (2013).
Janka G.E: Hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Hematology* 10 (suppl 1) 104–107 (2005).
Lavin M.F: Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signaling and cancer. *Nature Reviews Molecular and Cell Biology* 9:759–769 (2008).
Milner J.D.; Holland S.M: The cup runneth over: lessons from the ever-expanding pool of primary immunodeficiency diseases. *Nature Reviews Immunology* 13:635–668 (2013).
Notarangelo L.D: Functional T cell immunodeficiencies (with T cells present). *Annual Review of Immunology* 31:195–225 (2013).
Ochs H.D.; Thrasher A.J: The Wiskott-Aldrich syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117:725–738 (2006).
Parvaneh N.; Casanova J.L.; Notarangelo L.D.; Conley M.E: Primary immunodeficiencies: a rapidly evolving story. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131:314–323 (2013).
Puel A.; Yang K.; Ku C.L.; et al. Heritable defects of the human TLR signaling pathways. *Journal of Endotoxin Research* 11:220–224 (2005).

HIV e AIDS

Barouch D.H: Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature* 455:613–619 (2008).
Brenchley J.M.; Price D.A.; Douek D.C: HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nature Immunology* 7:235–239 (2006).
Douek D.C.; Roederer M.; Koup R.A: Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. Annual Review of Medicine 60:471 (2009).
Haase A.T: Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nature Reviews Immunology* 5:783–792 (2005).
Hladik F.; McElrath M.J: Setting the stage: host invasion by HIV. *Nature Reviews Immunology* 8:447–457 (2008).
Johnston M.I.; Fauci A.S: An HIV vaccine—evolving concepts. *New England Journal of Medicine* 356:2073–2081 (2007).
Kwong P.D.; Mascola J.R.; Nabel G.J: Broadly neutralizing antibodies and the search for an HIV-1 vaccine: the end of the beginning. *Nature Reviews Immunology* 13:693–701 (2013).
Lusso P: HIV and the chemokine system: 10 years later. *EMBO Journal* 25:447–456 (2006).
Mascola J.R.; Montefiori D.C: The role of antibodies in HIV vaccines. *Annual Review of Immunology* 28:413–444 (2010).
McMichael A.J.; Borrow P.; Tomaras G.D.; Goonetilleke N.; Haynes B.F: The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature Reviews Immunology* 10:11–23 (2010).
Nixon D.F.; Aandahl E.M.; Michaelsson J: CD4+CD25^{+} regulatory T cells in HIV infection. *Microbes and Infection* 7:1063–1065 (2005).
Walker B.; McMichael A: The T-cell response to HIV. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a007054 (2012).
Walker B.D.; Yu X.G: Unraveling the mechanisms of durable control of HIV-1. *Nature Reviews Immunology* 13:487–498 (2013).

Appendice

I



GLOSSARIO

Addressina Molecola di adesione espressa dalle cellule endoteliali in diverse sedi anatomiche che indirizza la localizzazione selettiva dei linfociti nei diversi organi. La molecola MadCAM-1 è un esempio di addressina espressa nelle placche di Peyer della parete intestinale, che lega l'integrina $\alpha_4\beta_7$ dei linfociti T indirizzando il loro homing intestinale.

Adiuvante Sostanza, distinta dall'antigene, che potenzia l'attivazione dei linfociti T promuovendo l'accumulo di cellule che presentano l'antigene (APC) nel sito di esposizione all'antigene e potenziando in tali cellule l'espressione di molecole costimolatorie e citochine.

Affinità Forza del legame tra un singolo sito di legame di una molecola (per esempio un anticorpo) e un ligando (per esempio un antigene). Si esprime come costante di dissociazione (K_d); una minore K_d indica una maggiore affinità di interazione.

Agammaglobulinemia legata al cromosoma X Malattia da immunodeficienza, detta anche agammaglobulinemia di Bruton, caratterizzata da un blocco nella maturazione iniziale dei linfociti B e una mancanza di Ig nel siero. I pazienti soffrono di infezioni ricorrenti da batteri piogeni. La malattia è causata da mutazioni o delezioni nel gene che codifica la tirosina chinasi Btk, un enzima coinvolto nella trasduzione del segnale nei linfociti B in via di sviluppo.

AIRE (*Autoimmune Regulator*) Regolatore dell'autoimmunità Proteina che induce l'espressione di antigeni caratteristici dei tessuti periferici nelle cellule epiteliali midollari timiche. Mutazioni del gene AIRE nell'uomo e nel topo portano a sindromi autoimmuni tessuto-specifiche, a causa della presentazione difettosa di antigeni tessutali nel timo e quindi dell'incapacità di eliminare le cellule specifiche per questi antigeni.

Allele Una delle diverse forme dello stesso gene presenti in un determinato locus genico. Un individuo eterozigote per un gene possiede due alleli differenti, uno per ciascun cromosoma, ereditati uno dal padre e l'altro dalla madre. Se in una popolazione un particolare gene presenta alleli differenti, tale gene è detto polimorfo. I geni MHC hanno numerosi alleli (vale a dire che sono altamente polimorfici).

Allergene Antigene che evoca una reazione di ipersensibilità immediata (allergica). Gli allergeni sono proteine o sostanze chimiche legate alle proteine che inducono la produzione di anticorpi IgE in individui atopici.

Allergia Disordine immunitario causato da una reazione di ipersensibilità immediata, che spesso prende il suo nome in base al tipo di antigene (allergene) che scatena la malattia (per esempio allergia alimentare, allergia alla puntura dell'ape, allergia alla penicillina). Tutte queste condizioni sono il risultato di una produzione di IgE stimolata dai linfociti T helper che producono IL-4, seguita da un'attivazione dei mastociti e dei basofili indotta dall'allergene e dalle IgE.

Alloanticorpo Anticorpo specifico per un alloantigene (cioè, un antigene presente in alcuni individui di una specie ma non in altri).

Alloantigene Antigene cellulare o tissutale che è presente in alcuni individui di una specie e non in altri e che è riconosciuto come estraneo in caso di allotrapianto. Gli alloantigeni sono prodotti di geni polimorfi.

Alloantisiero Siero che contiene alloanticorpi, ottenuto da un individuo precedentemente esposto a uno o più alloantigeni.

Alloreattivo Reattivo verso un alloantigene; si riferisce a linfociti T o anticorpi di un individuo che riconoscono antigeni espressi da cellule o tessuti di un altro individuo geneticamente non identico.

Allotipo Proprietà condivisa da un gruppo di anticorpi che riconoscono un particolare determinante antigenico espresso in modo selettivo dagli anticorpi di alcuni soggetti. Tali determinanti

antigenici sono detti allotopi. Gli anticorpi che condividono un particolare allotopo appartengono allo stesso allotipo. Il termine allotipo è spesso utilizzato come sinonimo di allotopo.

Amiloide sierica A (*Serum Amyloid A*, SAA) Proteina di fase acuta prodotta a livello epatico, la cui concentrazione sierica aumenta in modo significativo nel corso di processi infettivi e infiammatori, principalmente a causa dell'azione dell'IL-1 e del TNF. La proteina amiloide A sierica attiva nei leucociti la chemiotassi, la fagocitosi e l'adesione alle cellule endoteliali.

Amine biogene Composti non lipidici, a basso peso molecolare, come l'istamina, che sono tutti caratterizzati dalla presenza di un gruppo aminico; sono contenute nei granuli citoplasmatici dei mastociti da cui vengono rilasciate durante le reazioni di ipersensibilità immediata (allergica). Le amine biogene sono spesso chiamate amine vasoattive.

Anafilassi Severa forma di ipersensibilità immediata, detta anche shock anafilattico, in cui, a causa dell'attivazione sistemica di mastociti e basofili, si scatena il rilascio da parte di queste cellule di mediatori che causano broncocostrizione, edema tissutale e collasso cardiocircolatorio.

Anafilotossine Frammenti del complemento C5a, C4a e C3a che sono generati durante l'attivazione del complemento. Le anafilotossine legano specifici recettori della superficie cellulare e promuovono l'infiammazione acuta stimolando la chemiotassi dei neutrofili e attivando i mastociti.

Anergia Condizione di mancata responsività alla stimolazione antigenica. L'anergia linfocitaria (detta anche anergia clonale) rappresenta l'incapacità dei cloni dei linfociti T o B di rispondere all'antigene; può rappresentare un meccanismo per mantenere la tolleranza immunologica agli antigeni self. Nella pratica clinica, invece, il termine anergia si riferisce a un difetto generalizzato nello sviluppo di reazioni cutanee di ipersensibilità ritardata ai comuni antigeni dipendente dai linfociti T.

Anergia clonale Stato di mancata responsività dei linfociti T all'antigene che sperimentalmente può essere indotto dal riconoscimento dell'antigene in assenza dei segnali costimolatori. L'anergia clonale è considerata uno dei meccanismi di tolleranza agli antigeni self ed è comune anche ai linfociti B.

Angiogenesi Formazione di nuovi vasi regolata da molteplici fattori proteici prodotti da cellule dell'immunità innata e specifica, che spesso accompagna il processo dell'infiammazione cronica.

Antagonista del recettore dell'IL-1 (IL-1Ra) Inibitore naturale dell'IL-1 prodotto da fagociti mononucleati, strutturalmente omologo all'IL-1. Si lega agli stessi recettori, ma è biologicamente inattivo. IL-1Ra è utilizzato come trattamento per le sindromi autoimmuni provocate da una produzione sregolata di IL-1.

Anticorpi naturali Anticorpi IgM, in gran parte prodotti da linfociti B-1, specifici per batteri comuni nell'ambiente. I soggetti normali possiedono anticorpi naturali senza alcuna evidenza di infezione e questi anticorpi agiscono come meccanismi di difesa preformata contro i microrganismi che riescono a penetrare le barriere epiteliali. Alcuni di questi anticorpi presentano una reazione crociata con gli antigeni di gruppo sanguigno AB0 e sono responsabili delle reazioni trasfusionali.

Anticorpo Tipo di molecola glicoproteica, chiamata anche immunoglobulina (Ig), prodotta dai linfociti B e in grado di legare un antigene, spesso con un elevato grado di specificità e alta affinità. La struttura di base di un anticorpo è composta da due catene pesanti identiche e due catene leggere identiche. Le regioni aminoterminali variabili delle catene leggere e pesanti formano i siti di legame antigenico, mentre le regioni carbossiterminali costanti delle catene pesanti interagiscono funzionalmente con altre molecole nel sistema immune. In ogni individuo vi sono milioni di anticorpi differenti, ognuno con un sito di legame antigenico unico. Gli anticorpi secreti eseguono varie funzioni effettrici, tra cui la neutralizzazione degli antigeni, l'attivazione del complemento e la promozione della fagocitosi e la distruzione dei microrganismi.

Anticorpo monoclonale Anticorpo specifico per un antigene prodotto da un ibridoma dei linfociti B (una linea cellulare derivata dalla fusione di un linfocita B normale con una cellula tumorale immortalizzata di mieloma). Gli anticorpi monoclonali sono ampiamente utilizzati in ricerca, in diagnostica e in terapia.

Anticorpo umanizzato Anticorpo monoclonale codificato da un gene ibrido ricombinante e composto dalle sedi leganti l'antigene di un anticorpo monoclonale murino e dalla regione costante di un anticorpo umano. Gli anticorpi umanizzati hanno una minore probabilità, rispetto agli anticorpi monoclonali murini, di indurre una risposta antianticorpo nell'uomo; essi sono usati in clinica per il trattamento di malattie infiammatorie, nei tumori e nel rigetto di trapianto.

Antigene Molecola che si lega a un anticorpo o a un recettore per l'antigene del linfocita T (*T Cell Receptor*, TCR). Gli antigeni che si legano ad anticorpi comprendono tutte le classi di molecole. La maggior parte dei TCR lega solo frammenti peptidici delle proteine complessati con le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità; sia il ligando peptidico sia la proteina nativa da cui esso deriva sono detti antigeni T-dipendenti.

Antigene carcinoembrionario (CEA, CD66) Proteina di membrana altamente glicosilata, la cui aumentata espressione da parte di molti carcinomi del colon, del pancreas, dello stomaco e della mammella si traduce in un aumento del livello sierico. Il livello di CEA nel siero serve per monitorare la persistenza o la recidiva di un carcinoma metastatico dopo il trattamento chemioterapico.

Antigene T-dipendente Antigene che richiede l'intervento sia dei linfociti B sia dei linfociti T helper per stimolare una risposta anticorpale. Gli antigeni T-dipendenti sono tutti gli antigeni proteici che contengono sia epitopi riconosciuti dai linfociti T sia altri epitopi riconosciuti dai linfociti B. I linfociti T helper producono citochine e molecole della superficie cellulare che stimolano la crescita e la differenziazione dei linfociti B in cellule secernenti anticorpi. Le risposte immunitarie umorali agli antigeni T-dipendenti sono caratterizzate da scambio dell'isotipo, maturazione dell'affinità e generazione della memoria.

Antigene T-indipendente Antigene non proteico, come i polisaccaridi e i lipidi, che può stimolare le risposte anticorpali senza la necessità dell'intervento dei linfociti T helper antigene-specifici. Gli antigeni T-indipendenti in genere contengono più copie identiche dello stesso epitopo che possono presentare una reazione crociata con i recettori per l'antigene dei linfociti B, attivandoli. Le risposte immunitarie umorali agli antigeni T-indipendenti mostrano solo in minimo grado il fenomeno dello scambio di isotipo della catena pesante o della maturazione dell'affinità, due processi che richiedono segnali provenienti dai linfociti T helper.

Antigene tumore-specifico Antigene la cui espressione è limitata a un particolare tumore e che non è espresso dalle cellule normali. Gli antigeni tumore-specifici possono fungere da antigeni bersaglio per le risposte immunitarie dirette contro il tumore.

Antigene tumore-specifico di trapianto (*Tumor-Specific Transplantation Antigen*, TSTA) Antigene espresso su cellule di tumori sperimentali murini, che può essere rivelato inducendo un rigetto immunologico del tumore trapiantato. I TSTA, originariamente identificati su sarcomi murini indotti da cancerogeni chimici, stimolano il rigetto del tumore trapiantato da parte dei linfociti T citotossici.

Antigeni oncofetali Proteine espresse a livelli elevati in alcuni tipi di cellule tumorali e nei tessuti normali in via di sviluppo fetali (ma non nei tessuti adulti). Gli anticorpi specifici per queste proteine sono spesso usati per l'identificazione istopatologica dei tumori o per monitorare la progressione della crescita tumorale nel paziente. L'antigene carcinoembrionario (CEA, CD66) e l'α-fetoproteina sono due antigeni oncofetali frequentemente espressi da alcuni carcinomi.

Antisiero Siero proveniente da un soggetto precedentemente immunizzato contro un antigene e che contiene anticorpi specifici per quell'antigene.

Aplotipo L’insieme di alleli MHC ereditato da un genitore e pertanto presente su uno dei due cromosomi.

Apoptosi Processo di morte cellulare, caratterizzato da attivazione delle caspasi intracellulari, frammentazione del DNA, condensazione e frammentazione del nucleo e vescicolazione della membrana plasmatica, che porta a fagocitosi della cellula senza indurre una risposta infiammatoria. Questo tipo di morte cellulare è importante nello sviluppo dei linfociti, nel ritorno all’omeostasi dopo una risposta immunitaria a un’infezione, nel mantenimento della tolleranza verso gli antigeni self e nell’uccisione delle cellule infettate da parte dei linfociti T citotossici e delle cellule natural killer.

Aptene Molecola a basso peso molecolare che può essere legata da un anticorpo, ma che deve essere complessata a una macromolecola con funzioni di “carrier” per evocare una risposta anticorpale. Per esempio, l’inoculo di dinitrofenolo (DNP) non è sufficiente a stimolare una risposta anticorpale anti-DNP, ma l’immunizzazione con l’aptene DNP complessato con una proteina carrier stimola la produzione di anticorpi anti-DNP.

Arteriosclerosi del trapianto Occlusione delle arterie del trapianto dovuta a proliferazione delle cellule muscolari lisce della tonaca intima. Questo fenomeno si manifesta entro 6 mesi-1 anno dal trapianto ed è responsabile del rigetto cronico di trapianti d’organo vascolarizzati. La sua eziologia è probabilmente il risultato di una risposta immunitaria cronica ad alloantigeni della parete vascolare. È detta anche arteriosclerosi accelerata.

Artrite reumatoide Malattia autoimmune caratterizzata da danno infiammatorio alle articolazioni e talvolta da interessamento delle pareti dei vasi sanguigni, dei polmoni e di altri tessuti. A livello della sinovia che riveste le articolazioni infiammate si osservano linfociti T $CD4^+$, linfociti B attivati e plasmacellule; nel liquido sinoviale si ritrovano numerose citochine proinfiammatorie, tra cui l’IL-1 e il TNF.

Asma bronchiale Malattia infiammatoria causata generalmente da ripetute reazioni di ipersensibilità immediata nel polmone, che portano a ostruzione intermittente e reversibile delle vie aeree, infiammazione bronchiale cronica, eosinofilia e ipertrofia e iperreattività delle cellule muscolari lisce bronchiali.

Atopia Predisposizione di un individuo a produrre anticorpi IgE in risposta a diversi antigeni ambientali e a sviluppare forti risposte di ipersensibilità immediata (allergiche). Gli individui allergici agli antigeni ambientali, come il polline o le polveri domestiche, sono chiamati atopici.

Attivatori policlonali Agenti che sono in grado di attivare molti cloni dei linfociti, indipendentemente dalla loro specificità antigenica. Esempi di attivatori policlonali comprendono gli anticorpi anti-IgM per i linfociti B e gli anticorpi anti-CD3 e le fitoemoagglutinine per i linfociti T.

Attivazione alternativa dei macrofagi L’attivazione dei macrofagi da parte dell’IL-4 e dell’IL-13 determina un fenotipo antinfiammatorio e prono alla riparazione dei tessuti, in contrasto con la classica attivazione dei macrofagi da parte dell’interferone-γ e dei ligandi dei recettori Toll-like.

Attivazione classica dei macrofagi L’attivazione dei macrofagi da parte dell’interferone-γ e dei ligandi dei recettori Toll-like porta a un fenotipo proinfiammatorio e microbicida. I macrofagi attivati attraverso la via classica sono anche detti macrofagi M1.

Autoanticorpo Anticorpo specifico per un antigene self. Gli autoanticorpi possono causare un danno a cellule e tessuti e sono prodotti in eccesso in molte malattie autoimmuni, come il lupus eritematoso sistemico.

Autofagia Normale processo con cui una cellula degrada i suoi stessi componenti attraverso il catabolismo lisosomiale. L’autofagia gioca un ruolo nella difesa immunitaria innata contro le infezioni e i polimorfismi dei geni che regolano l’autofagia sono legati al rischio di sviluppare alcune patologie autoimmuni.

Autoimmunità Risposta del sistema immunitario specifico verso antigeni autologhi che si realizza quando vengono meno i meccanismi di tolleranza al self.

Avidità Forza complessiva di interazione tra due molecole, per esempio un anticorpo e un antigene. L'avidità dipende sia dall'affinità sia dalla valenza delle interazioni, pertanto l'avidità per un antigene polivalente di un anticorpo IgM pentamerico, con dieci siti di legame per l'antigene, può essere molto maggiore dell'avidità di una molecola di IgG che possiede solo due siti di legame. Il concetto di avidità può anche essere riferito alla forza di interazione tra due cellule, mediata da numerose interazioni di legame tra molecole della superficie cellulare.

β_2-microglobulina Catena leggera del complesso maggiore di istocompatibilità (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) di classe I. La β_2-microglobulina è una proteina extracellulare codificata da un gene non polimorfo collocato al di fuori del locus che codifica per l'MHC. La β_2-microglobulina è strutturalmente simile ai domini Ig ed è condivisa da tutte le molecole MHC di classe I.

Basofilo Tipo di granulocita circolante derivato dal midollo osseo, che presenta affinità strutturali e funzionali con i mastociti, compresa la presenza di granuli che contengono numerosi mediatori chimici dell'infiammazione presenti nei mastociti, e l'espressione di un recettore per Fc a elevata affinità per le IgE. I basofili reclutati nei tessuti in cui è presente l'antigene possono contribuire alle reazioni di ipersensibilità immediata.

Batteri piogeni Batteri, come gli stafilococchi e gli streptococchi Gram-positivi, che inducono risposte infiammatorie ricche in leucociti polimorfonucleati (che danno luogo alla formazione di pus). Le risposte anticorpali a questi batteri aumentano notevolmente l'efficacia dei meccanismi effettori dell'immunità innata nell'eliminare le infezioni.

Batterio intracellulare Un batterio che sopravvive e si replica all'interno delle cellule, in genere nei fagolisosomi. La principale difesa contro i batteri intracellulari, come *Mycobacterium tuberculosis*, è l'immunità T cellulo-mediata.

Bcl-2, famiglia di proteine Famiglia di proteine citoplasmatiche e della membrana mitocondriale dotate di parziale omologia, che regolano l'apoptosi influenzando la permeabilità della membrana esterna dei mitocondri. I membri della famiglia possono essere proapoptotici (Bax, Bad e Bak) o antiapoptotici (Bcl-2 e Bcl-xL).

Bcl-6 Repressore della trascrizione necessario per lo sviluppo del centro germinativo dei linfociti B e per lo sviluppo delle cellule T helper follicolari.

BLIMP-1 Repressore della trascrizione necessario per la generazione delle plasmacellule.

Burst respiratorio Processo attraverso cui i macrofagi e i leucociti polimorfonucleati producono specie reattive dell'ossigeno, come l'anione superossido, il radicale idrossilico e il perossido di idrogeno. Il burst respiratorio è mediato dall'enzima ossidasi fagocitica ed è generalmente innescato dai mediatori della flogosi, come l'LTB4, il PAF e il TNF, o da prodotti di origine batterica, come i peptidi *N*-formilmetioninici.

C1 Proteina sierica del sistema del complemento composta da numerose catene polipeptidiche. Questa proteina è responsabile dell'innesco della via classica di attivazione del complemento legandosi alla porzione Fc delle IgG o delle IgM che hanno legato l'antigene.

C3 Proteina del sistema del complemento maggiormente rappresentata a livello sierico e che svolge la funzione centrale; è coinvolta sia nella cascata della via classica sia in quella della via alternativa. La C3 viene tagliata proteoliticamente durante l'attivazione del complemento, generando il frammento C3b, che si lega in modo covalente alla superficie delle cellule o dei microbi, e il frammento C3a, dotato di numerose attività proinfiammatorie.

C3 convertasi Complesso enzimatico multiproteico generato durante le prime fasi di attivazione della via classica, lectinica e alternativa del complemento; scinde la C3, dando origine a due frammenti

proteolitici denominati C3a e C3b.

C5 convertasi Complesso enzimatico multiproteico generato dal legame del frammento C3b alla C3 convertasi; scinde la frazione C5 e innesca le ultime fasi di attivazione del complemento.

Calcineurina Fosfatasi citoplasmatica serina/treonina che defosforila il fattore di trascrizione NFAT consentendone l'entrata nel nucleo. La calcineurina è attivata dall'aumento della concentrazione di calcio intracellulare generato dalla trasduzione del segnale del TCR in seguito al riconoscimento dell'antigene; i farmaci immunosoppressivi ciclosporina e FK-506 agiscono bloccando l'attività della calcineurina.

Cascata della proteina chinasi attivata da mitogeno (*Mitogen-Activated Protein Kinase*, MAPK) Cascata di trasduzione del segnale innescata dall'attivazione della proteina Ras che coinvolge l'attivazione sequenziale di tre serina/treonina chinasi, di cui l'ultima è la MAPK. La MAPK, a sua volta, fosforila e attiva altri enzimi o fattori di trascrizione. La via delle MAP chinasi è una delle molte vie di trasduzione del segnale attivate dal legame dell'antigene al TCR e BCR.

Caspasi Proteasi intracellulari con un dominio cisteinico nel loro sito catalitico, degradano il substrato mediante il taglio proteolitico a livello dell'estremità carbossiterminale dei residui di acido aspartico. La maggior parte delle caspasi sono componenti della cascata enzimatica che causa la morte apoptotica delle cellule; tuttavia la caspasi-1, componente dell'inflammasoma, induce infiammazione processando le forme inattive dei precursori delle citochine IL-1 e IL-18 nelle loro forme attive.

Catelicidine Polipeptidi prodotti dai neutrofili e dalle cellule che costituiscono le barriere epiteliali. Queste proteine possiedono svariate funzioni nell'ambito dell'immunità innata, tra cui l'azione citotossica nei confronti dei microrganismi, l'attivazione leucocitaria e la neutralizzazione del lipopolisaccaride batterico.

Catena ζ Proteina di transmembrana espressa dai linfociti T nell'ambito del complesso del TCR; contiene nella porzione citoplasmatica sequenze ITAM e si lega alla tirosina chinasi ZAP-70 nel corso dell'attivazione dei linfociti T.

Catena di legame J Polipetide che lega le IgA o le IgM a formare multimeri (per esempio IgA dimeriche e IgM pentameriche).

Catena invariante (I_i) Proteina non polimorfa che si lega nel reticolo endoplasmatico alle molecole MHC di classe II neosintetizzate. La catena invariante impedisce che i peptidi presenti nel reticolo endoplasmatico possano interagire con la tasca per il legame dei peptidi di tali molecole, consentendo a questi peptidi di legare molecole di classe I. La catena invariante promuove anche il ripiegamento e l'assemblaggio delle molecole di classe II di nuova formazione indirizzandole verso un compartimento endosomiale specializzato chiamato MIIC, dove ha luogo il caricamento dei peptidi.

Catena J Piccolo polipeptide legato con un ponte disolfuro alla coda delle immunoglobuline IgM e IgA multimeriche che permette il loro trasporto transepiteliale.

Catena leggera delle immunoglobuline Uno dei due tipi di catene polipeptidiche che compongono una molecola anticorpale. L'unità strutturale di base di un anticorpo comprende due catene leggere identiche, ciascuna legata con un ponte disolfuro a una delle due catene pesanti, anch'esse identiche tra loro. Ciascuna catena leggera è composta da un dominio Ig variabile (V) e un dominio Ig costante (C). Esistono due isotipi di catena leggera, denominati κ e λ, entrambi funzionalmente identici. Il 60% circa degli anticorpi umani presenta la catena leggera κ e il restante 40% la catena leggera λ.

Catena pesante delle immunoglobuline Uno dei due tipi di catene polipeptidiche che compongono una molecola anticorpale. L'unità strutturale di base di un anticorpo comprende due catene pesanti identiche legate con ponti disolfuro e due catene leggere identiche. Ciascuna catena pesante è composta da un dominio Ig variabile (V) e tre o quattro domini Ig costanti (C). I differenti isotipi

anticorpali (IgM, IgD, IgG, IgA e IgE) sono distinti in base a differenze strutturali delle regioni costanti delle loro catene pesanti. Le regioni costanti della catena pesante mediano anche le funzioni effettrici, come l'attivazione del complemento e il coinvolgimento dei fagociti.

Catene leggere sostitutive Due proteine non polimorfe che si associano nei linfociti pre-B alla catena pesante μ dell'Ig a formare il recettore dei linfociti pre-B. Le due proteine delle catene leggere sostitutive comprendono la proteina pre-B V, omologa al dominio V della catena leggera, e la proteina λ5, legata in modo covalente alla catena pesante μ tramite un ponte disolfuro.

Catepsine Proteasi tiolaspartiche con un ampio spettro di specificità, che sono abbondanti negli endosomi delle APC e svolgono probabilmente un ruolo importante nel generare frammenti peptidici che si legano alle molecole MHC di classe II.

Cellula che presenta l'antigene (*Antigen Presenting Cell*, APC) Cellula che espone sulla sua superficie frammenti peptidici di antigeni proteici in associazione a molecole dell'MHC e attiva i linfociti T antigene-specifici. Per attivare in maniera ottimale i linfociti T, oltre a presentare i complessi MHC-peptide, le APC devono esprimere anche molecole costimolatorie.

Cellula che presenta l'antigene (APC) professionale Termine solitamente usato per indicare APC in grado di attivare i linfociti T e che include cellule dendritiche, fagociti mononucleati e linfociti B, tutti in grado di esprimere molecole MHC di classe II e molecole costimolatorie. Le cellule dendritiche rappresentano le APC professionali più importanti per iniziare la risposta primaria dei linfociti T.

Cellula staminale Cellula indifferenziata che si divide continuamente e dà origine a ulteriori cellule staminali e a cellule di diversi stipiti cellulari. Per esempio tutte le cellule ematiche originano da una cellula staminale comune emopoietica del midollo osseo.

Cellula staminale ematopoietica Cellula indifferenziata del midollo osseo che si divide continuamente dando origine a nuove cellule staminali e a cellule destinate a maturare verso diversi stipiti differenziativi. Una cellula staminale emopoietica midollare potrà differenziarsi in cellule della linea linfoide, mieloide ed eritrocitaria.

Cellule dendritiche (*Dendritic Cells*, DC) Cellule derivate dal midollo osseo che si ritrovano negli epiteli e nei tessuti linfoidi. Sono caratterizzate dal punto di vista morfologico da sottili proiezioni citoplasmatiche. Esistono molte popolazioni di DC con funzioni diverse. Le cellule dendritiche classiche funzionano come cellule sentinella, divengono cellule che presentano l'antigene per linfociti T naïve in seguito all'attivazione, e sono importanti per l'inizio della risposta immunitaria specifica agli antigeni proteici. Le DC classiche sono importanti per l'induzione della tolleranza agli antigeni autologhi. Le cellule dendritiche plasmacitoidi producono una quantità abbondante di interferoni di tipo 1 in risposta all'esposizione ai virus.

Cellule dendritiche follicolari Cellule nei follicoli linfatici degli organi linfoidi secondari che esprimono recettori per il complemento, recettori per Fc e CD40L; morfologicamente caratterizzate da lunghi processi citoplasmatici che formano una sorta di impalcatura che è parte integrante dell'architettura dei follicoli. Le cellule dendritiche follicolari espongono sulla superficie gli antigeni che verranno riconosciuti dai linfociti B; durante il processo di maturazione dell'affinità, sono coinvolte nell'attivazione e nella selezione dei linfociti B che esprimono Ig di membrana ad alta affinità. Esse sono cellule non ematopoietiche (ovvero non originate dal midollo osseo).

Cellule di Langerhans Cellule dendritiche immature i cui prolungamenti citoplasmatici formano una rete continua nello strato epidermico della cute, la cui principale funzione è catturare i microbi e gli antigeni che entrano attraverso la pelle e trasportare gli antigeni ai linfonodi drenanti. Nel corso della loro migrazione verso i linfonodi, le cellule di Langerhans si differenziano in cellule dendritiche mature, che possono efficacemente presentare l'antigene ai linfociti T naïve.

Cellule effettrici Cellule che svolgono funzioni effettrici durante una risposta immunitaria, come la secrezione di citochine (linfociti T helper), l'uccisione di microrganismi (macrofagi, neutrofili ed eosinofili), l'uccisione di cellule ospiti infettate da microrganismi (CTL) o la secrezione di anticorpi (linfociti B differenziati).

Cellule epiteliali timiche Cellule epiteliali, numerose nello stroma della corticale e della midollare del timo, che svolgono un ruolo importante nello sviluppo dei linfociti T. Le cellule epiteliali timiche producono fattori, come l'IL-7, richiesti nelle fasi precoci dello sviluppo della maturazione dei linfociti T. Durante il processo di selezione positiva, i linfociti T in corso di maturazione che riconoscono anche debolmente i peptidi self legati alle molecole MHC sulle cellule epiteliali timiche vengono salvaguardati dalla morte cellulare programmata.

Cellule induttrici di tessuto linfoide Tipo di cellula linfoide innata di derivazione ematopoietica che stimola lo sviluppo dei linfonodi e di altri organi linfoidi secondari, in parte attraverso la produzione di linfotossina α (LTα) e linfotossina β (LTβ).

Cellule LAK (*Lymphokine Activated Killer cells*) Cellule NK dotate di attività citolitica potenziata nei confronti delle cellule tumorali in seguito all'esposizione a elevate dosi di IL-2. Le cellule LAK generate *in vitro* possono essere ritrasferite adottivamente in pazienti neoplastici nel tentativo di curare il tumore.

Cellule M Cellule epiteliali specializzate della mucosa gastrointestinale localizzate in corrispondenza delle placche di Peyer nell'intestino e coinvolte nel trasporto dell'antigene alle placche di Peyer.

Cellule natural killer (NK) Sottotipo di cellule linfoidi innate che agiscono nelle risposte immunitarie innate per uccidere le cellule infettate da microbi e attivare i fagociti mediante la secrezione dell'IFN-γ. Le cellule NK non esprimono recettori per l'antigene distribuiti clonalmente, come le Ig o il TCR, e la loro attivazione è regolata dall'azione bilanciata tra recettori di membrana ad azione stimolatrice e inibitoria, questi ultimi capaci di riconoscere le molecole MHC self.

Cellule natural killer T (NKT) Piccola sottopopolazione di linfociti che esprimono il TCR e alcune molecole caratteristiche delle cellule NK. Alcune cellule NKT, chiamate cellule NKT invariate (iNKT), esprimono TCRαβ dotati di repertorio molto limitato, riconoscono antigeni lipidici complessati con CD1 e hanno funzioni tipiche delle cellule T helper.

Cellule secernenti anticorpi Linfociti B che sono andati incontro a differenziazione e producono Ig in forma secreta. Le cellule secernenti anticorpi sono generate da linfociti B naïve in risposta ad antigeni e risiedono nei follicoli linfoidi della milza e dei linfonodi, nonché nel midollo osseo. Spesso sono chiamate anche plasmacellule.

Cellule soppressorie di derivazione mieloide Gruppo eterogeneo di precursori mieloidi immaturi che sopprimono le risposte immunitarie anti-tumorali e si trovano nei tessuti linfoidi, nel sangue e nei tessuti trasformati di animali e di pazienti portatori di tumori. Nel topo, queste cellule esprimono Ly6C o Ly6G e Cd11b nell'uomo e CD33, CD11b e CD15.

Centri germinativi Strutture specializzate degli organi linfoidi, generate durante la risposta umorale verso antigeni di natura proteica. Qui hanno luogo la proliferazione dei linfociti B, lo scambio isotipico, la mutazione somatica, la maturazione dell'affinità, la generazione di cellule B della memoria e l'induzione di plasmacellule a lunga sopravvivenza. I centri germinativi appaiono come regioni chiare nei follicoli linfoidi della milza, nei linfonodi e nel tessuto linfatico associato alle mucose.

Centroblasti Linfociti B in rapida proliferazione, presenti a livello della zona scura dei centri germinativi dei tessuti linfoidi secondari, che danno origine a migliaia di cellule figlie, esprimono la deaminasi indotta dall'attivazione (*Activation Induced Deaminase*, AID) e subiscono mutazioni somatiche a carico dei loro segmenti genici *V*. I centroblasti si trasformano in centrociti nella zona chiara dei centri germinativi.

Centrociti Linfociti B occupanti la zona chiara dei centri germinativi degli organi linfoidi secondari, che sono la progenie dei centroblasti proliferanti nella zona scura. I centrociti che esprimono Ig ad alta affinità sono selezionati in modo positivo, subiscono switch isotipico (o scambio di classe) e si differenziano in plasmacellule a lunga vita e in linfociti B della memoria.

Ceppi congenici Ceppi di topi inbred, identici tra loro per tutti i loci genici eccetto uno, per il quale essi sono selezionati per essere differenti; questi ceppi vengono generati mediante incroci ripetitivi e una selezione per un particolare carattere. Ceppi congenici che differiscono l'uno dall'altro solo a livello di particolari alleli MHC sono stati utilizzati per definire le funzioni delle molecole MHC.

Ceppo di topi inbred Ceppo di topi creato mediante ripetuti incroci tra consanguinei, in cui ogni locus genico è in stato di omozigosi. Ogni topo di un ceppo inbred è geneticamente identico (singenico) a ogni altro topo dello stesso ceppo.

Chemochine Ampia famiglia di citochine con omologia strutturale a basso peso molecolare; stimolano la chemotassi dei leucociti e ne regolano la migrazione dal sangue ai tessuti attivando le integrine leucocitarie; mantengono l'organizzazione spaziale dei differenti sottogruppi di linfociti e di cellule presentanti l'antigene all'interno degli organi linfoidi.

Chemotassi Migrazione di una cellula secondo un gradiente di concentrazione chimica. La migrazione di leucociti nei vari tessuti è spesso guidata da gradienti di chemochine.

Chinasi (proteina chinasi) Enzima che aggiunge gruppi fosfato alle catene laterali di determinati residui aminoacidici sulle proteine. Nei linfociti le proteine chinasi, come Lck, sono coinvolte nella trasduzione dei segnali intracellulari e nell'attivazione dei fattori trascrizionali. La maggior parte delle proteine chinasi fosforila in modo specifico residui di tirosina sulle proteine substrato.

Ciclosporina Inibitore della calcineurina ampiamente utilizzato come farmaco immunosoppressore per prevenire il rigetto dell'allotrapianto bloccando l'attivazione dei linfociti T. La ciclosporina si lega a una proteina citosolica detta ciclofilina; i complessi ciclosporina-ciclofilina si legano a loro volta alla fosfatasi calcineurina inibendola, prevenendo pertanto l'attivazione e la traslocazione nucleare del fattore di trascrizione NFAT.

Citochine Proteine secrete che agiscono come mediatori delle reazioni immunitarie e infiammatorie. Nelle risposte immunitarie innate le citochine sono prodotte da macrofagi e cellule NK, mentre nelle risposte immunitarie specifiche sono prodotte principalmente dai linfociti T (vedi anche l'Appendice II).

Citometria a flusso Metodo di analisi del fenotipo delle popolazioni cellulari che richiede una strumentazione particolare (citometro a flusso) in grado di rilevare la fluorescenza di singole cellule in sospensione e quindi di determinare sia il numero delle cellule che esprimono una determinata molecola a cui si lega una sonda fluorescente specifica che la quantità relativa della molecole espressa. A tale scopo, le sospensioni cellulari sono incubate con anticorpi marcati con un fluorocromo o con altre sonde e la quantità di sonda legata a ogni cellula della popolazione è misurata facendo passare le cellule una alla volta attraverso un fluorimetro con raggio laser incidente.

Citotossicità cellulare mediata da anticorpi (*Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*, ADCC) Processo attraverso cui le cellule natural killer (NK) sono indirizzate verso le cellule rivestite da IgG, causandone la lisi. Un recettore specifico per la regione costante delle IgG, denominato FcγRIII (CD16), è espresso sulla membrana delle cellule NK e media il legame alle IgG.

Clone Gruppo di cellule derivanti da un precursore comune e mantenenti molte delle caratteristiche genotipiche e fenotipiche del precursore cellulare originario. Nell'immunità adattativa, tutti i membri di un clone di linfociti condividono un unico e identico riarrangiamento genico delle Ig o del TCR, sebbene i geni *V* riarrangiati di un clone di cellule B possano avere delle variazioni di

sequenza genica a causa dei processi di ipermutazione somatica che si verificano dopo la ricombinazione V(D)J.

Coinibitore Proteina di membrana espressa dalle cellule che presentano l'antigene, dai linfociti T regolatori, dai linfociti B o dalle cellule tissutali, in grado di legare i recettori inibitori espressi dai linfociti T effettori e indurre segnali che bloccano la capacità di queste cellule di essere attivate dall'antigene. Un esempio è rappresentato da PD-L1, un coinibitore espresso da vari tipi cellulari, che si lega a PD-1 espresso dai linfociti T effettori. Il blocco dell'interazione PD-L1/PD-1 viene utilizzato come bersaglio terapeutico per aumentare le risposte anti-tumorali e anti-virali dei linfociti T.

Collectine Famiglia di proteine, che comprende le lectine leganti il mannosio (*Mannose-Binding Lectin*, MBL), caratterizzate dalla presenza di un dominio collageno-simile e un dominio lectinico (cioè legante i carboidrati). Le collectine svolgono un ruolo nell'immunità innata agendo come recettori di riconoscimento del profilo microbico e possono attivare il sistema del complemento legandosi al C1q.

Colpo letale Termine usato per descrivere gli eventi causati da un CTL e che portano a un danno irreversibile della cellula bersaglio. Il colpo letale consiste nell'esocitosi dei granuli dei CTL, e nel rilascio di perforina e di enzimi che inducono apotosi (granzimi) nel citoplasma della cellula bersaglio.

Complemento Sistema di proteine solubili e di membrana che interagiscono l'una con l'altra e con altre molecole del sistema immunitario per generare importanti effettori delle risposte immunitarie innate e specifiche. Vi sono tre vie di attivazione del complemento che differiscono per le modalità di avvio. La via classica, quella alternativa e quella lectinica del sistema del complemento sono attivate rispettivamente da complessi antigene-anticorpo, da superfici microbiche e da lectine plasmatiche legate ai microrganismi e consistono in una cascata di enzimi proteolitici che genera mediatori infiammatori e opsonine. Tutte le vie portano alla formazione di un complesso litico che si inserisce nella membrana delle cellule bersaglio.

Complesso di attacco della membrana (*Membrane Attack Complex*, MAC) Complesso litico costituito dalle componenti terminali della cascata del complemento, comprendente numerose molecole di C9, che si forma sulla membrana delle cellule bersaglio su cui viene attivato il complemento. Il MAC causa alterazioni letali dell'equilibrio ionico e osmotico della cellula bersaglio.

Complesso maggiore di istocompatibilità (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) Grande locus genico (localizzato nell'uomo sul cromosoma 6 e sul cromosoma 17 nel topo) che comprende i geni altamente polimorfi che codificano per le molecole leganti i peptidi che sono riconosciuti dai linfociti T. Il locus MHC comprende anche geni che codificano per le citochine, le molecole coinvolte nella processazione dell'antigene e le proteine del complemento.

Complesso recettoriale per l'antigene dei linfociti B (*BCR Complex*) Complesso multiproteico espresso sulla superficie dei linfociti B che riconosce l'antigene e trasduce segnali di attivazione. Il complesso BCR comprende le Ig di membrana, responsabili del legame con l'antigene, e le proteine associate Igα e Igβ, che attivano la cascata di trasduzione del segnale intracellulare.

Complesso TCR (*TCR Complex*) Complesso multiproteico di membrana espresso dai linfociti T, composto dall'eterodimero TCR (legante l'antigene) diversificato tra i differenti linfociti T, e le catene non polimorfe di CD3 γ, δ ed ε e la catena ζ (coinvolte nella trasduzione del segnale).

Componente secretoria Porzione del dominio extracellulare del recettore poli-Ig che viene scissa per via proteolitica e che rimane legata covalentemente alle molecole di IgA secrete nel lume intestinale.

Corecettore Componente del complesso recettoriale sulla superficie del linfocita che lega l'antigene contemporaneamente all'Ig di membrana o al TCR e che trasduce i segnali intracellulari necessari

per un'attivazione ottimale del linfocita. CD4 e CD8 sono corecettori dei linfociti T che legano regioni non polimorfe di una molecola MHC nel momento in cui un TCR interagisce con le regioni polimorfe di tale molecola e con il peptide da essa presentato. Il recettore del complemento di tipo 2 (CR2) è un corecettore presente sui linfociti B che si lega ad antigeni ricoperti dal frammento del complemento quando l'Ig di membrana lega un epitopo dello stesso antigene.

Costimolatore Molecola espressa sulla superficie delle APC in risposta agli stimoli innati immunitari, che fornisce uno stimolo, in aggiunta a quello antigenico (il "secondo segnale") richiesto per l'attivazione dei linfociti T naïve. Le molecole costimolatorie più conosciute sono le B7 (CD80 e CD86), espresse sulle APC professionali, che interagiscono con il recettore CD28, espresso sui linfociti T. Altri costimolatori si legano a recettori espressi sui linfociti T attivati, inducendone un miglioramento delle risposte effettrici.

Cross-matching (abbinamento donatore-ricevente) Test di screening realizzato per ridurre al minimo la possibilità di reazioni trasfusionali avverse o di rigetto del trapianto, in cui il paziente che necessita di una trasfusione ematica o di un allotrapianto è testato per la presenza di anticorpi preformati contro gli antigeni di superficie delle cellule del donatore (in genere gli antigeni dei gruppi sanguigni o gli antigeni dell'MHC). Il test comporta l'incubazione del siero del ricevente con i leucociti o gli eritrociti del potenziale donatore e l'analisi dell'eventuale agglutinazione o lisi delle cellule dipendente dal complemento.

Cross-presentazione Meccanismo attraverso cui una cellula dendritica attiva un linfocita $CD8^+$ naïve verso gli antigeni di una cellula (per esempio una cellula infettata da un virus o neoplastica). Il fenomeno della cross-presentazione ha luogo, per esempio, quando una cellula infettata (spesso apoptotica) viene fagocitata da una cellula dendritica e gli antigeni microbici vengono processati e presentati in associazione con le molecole MHC di classe I. Questo contraddice la regola generale per cui antigeni fagocitati sono presentati sulle molecole MHC di classe II. La cellula dendritica fornisce anche la costimolazione per il linfocita T. La cross-presentazione è detta anche cross-priming.

CTLA-4 Proteina della superfamiglia delle Ig espressa sulla superficie dei linfociti T effettori attivati e Treg, che lega B7-1 e B7-2 con elevata affinità e gioca un ruolo fondamentale nell'inibire le risposte dei linfociti T. CTLA-4 ha una funzione chiave nel mediare l'attività soppressoria delle Treg e indurre tolleranza dei linfociti T verso gli antigeni self.

Deaminasi indotta da attivazione (*Activation-Induced [cytidine] Deaminase*, AID) Enzima espresso dai linfociti B che catalizza la conversione della citosina in uracile nelle molecole di DNA, un passaggio necessario per l'attivazione dei processi di ipermutazione somatica, maturazione dell'affinità e scambio di classe degli anticorpi.

Dectine Recettori di riconoscimento dei PAMP espressi dalle cellule dendritiche che riconoscono i carboidrati della parete di funghi. Danno segnali che promuovono l'infiammazione e potenziano le risposte dell'immunità adattativa.

Defensine Peptidi a elevato contenuto di residui di cisteina prodotti dalle barriere epiteliali nella pelle, nell'intestino, nei polmoni e in altri tessuti, oltre che nei granuli dei neutrofili; agiscono come antibiotici ad ampio spettro per un'ampia varietà di batteri e funghi. La sintesi delle defensine è aumentata in risposta alla stimolazione dei recettori dell'immunità innata come i recettori Toll-like e le citochine infiammatorie, come l'IL-1 e il TNF.

Deficit di adesione leucocitaria (*Leukocyte Adhesion Deficiency*, LAD) Raro gruppo di malattie da immunodeficienza causate dall'espressione deficitaria di molecole di adesione leucocitarie necessarie per il reclutamento tissutale dei fagociti e dei linfociti. La forma LAD I è dovuta a mutazioni del gene che codifica per la proteina CD18, appartenente alla famiglia delle integrine

β_2. La forma LAD II è causata da mutazioni del gene che codifica per un enzima coinvolto nella sintesi dei ligandi leucocitari per le selectine endoteliali.

Deficit selettivo di Ig Immunodeficienza caratterizzata dalla mancanza di una o di poche classi o sottoclassi di Ig. Il deficit selettivo di IgA è la forma più comune, seguito dalla carenza di IgG3 e IgG2. I pazienti con questi disturbi presentano un rischio elevato di contrarre infezioni batteriche; ciononostante, molti di essi sono del tutto normali.

Delezione clonale Meccanismo di tolleranza linfocitaria in cui una cellula T immatura timica o una cellula B immatura nel midollo osseo va incontro ad apoptosi a seguito del riconoscimento di un antigene self.

Desensibilizzazione Metodo per il trattamento delle malattie da ipersensibilità immediata (allergiche) che comporta la somministrazione ripetuta di basse dosi dell'antigene a cui l'individuo è allergico. Questo approccio terapeutico, il cui meccanismo non è ancora ben compreso, spesso impedisce l'insorgenza di gravi reazioni allergiche a una successiva esposizione all'antigene.

Determinante Porzione di un antigene macromolecolare a cui si legano un anticorpo o un TCR. Nel caso dei linfociti T, un determinante è la porzione peptidica di un antigene proteico che si lega a una molecola MHC ed è riconosciuta dal TCR. Il termine è sinonimo di epitopo.

Deviazione immunologica Conversione di una risposta cellulare T caratterizzata dalla produzione di determinate citochine (come le citochine T_H1 che stimolano le funzioni infiammatorie dei macrofagi) in una risposta caratterizzata dalla produzione di altre citochine (come quelle T_H2 che attivano le risposte anti-infiammatorie dei macrofagi).

Diabete di tipo I Malattia caratterizzata dalla mancanza di insulina che porta a varie anomalie metaboliche e vascolari. Il deficit di insulina deriva dalla distruzione autoimmune delle cellule β delle isole pancreatiche di Langerhans, in genere si manifesta durante l'infanzia. I linfociti CD4 e CD8, gli anticorpi e le citochine sono coinvolti nel danno alle isole pancreatiche. La malattia è detta anche diabete mellito insulino-dipendente.

Diacilglicerolo (DAG) Molecola di membrana coinvolta nella trasduzione del segnale che si genera nel corso dell'attivazione linfocitaria, in seguito all'attivazione della fosfolipasi C (PLCγ1) che scinde il fosfatidilinositolo 4,5-difosfato (PIP2), un fosfolipide di membrana. La principale funzione del DAG è quella di attivare la proteina chinasi C, un enzima che partecipa all'attivazione dei fattori trascrizionali.

Diffusione dell'epitopo Fenomeno che, nell'autoimmunità, consiste nello sviluppo di risposte immunitarie verso epitopi multipli durante la progressione di una malattia autoimmune originariamente causata dalla rottura di meccanismi di tolleranza verso un singolo epitopo. Questo fenomeno avviene probabilmente in seguito a ulteriori rotture dei meccanismi di tolleranza e al rilascio di antigeni tissutali aggiuntivi come conseguenza del processo infiammatorio stimolato dalla risposta iniziale.

Diversificazione L'esistenza in un individuo di un numero elevatissimo di cloni linfocitari con differenti specificità antigeniche (in altre parole, il repertorio linfocitario è molto ampio e differenziato). La diversificazione è una proprietà fondamentale dell'immunità specifica ed è la conseguenza dell'enorme variabilità strutturale dei siti combinatori di riconoscimento dell'antigene delle Ig e dei TCR.

Diversità combinatoria Diversità delle specificità antigeniche delle Ig e dei TCR dovuta all'utilizzo di differenti combinazioni dei diversi segmenti genici V, D e J nei processi di ricombinazione somatica del DNA nei loci Ig e TCR, che avvengono durante lo sviluppo dei linfociti B e T. Questo meccanismo, che agisce insieme alla diversità giunzionale, genera un numero di geni per i recettori per l'antigene molto grande a partire da un numero limitato di segmenti genici.

Diversità giunzionale La diversità nei repertori degli anticorpi e del TCR dovuta all'aggiunta o alla rimozione casuale di sequenze nucleotidiche alle giunzioni tra i segmenti genici V, D e J.

DM Vedi **HLA-DM**.

Dominio immunoglobulinico (dominio Ig) Motivo strutturale tridimensionale di forma globulare presente in molte proteine del sistema immunitario, tra cui le Ig, il TCR e le molecole MHC. I domini Ig hanno una lunghezza di circa 110 aminoacidi, contengono un ponte disolfuro interno e sono formati da due strati a foglietti β-pieghettati, ciascuno composto da 3-5 segmenti polipeptidici antiparalleli.

Dominio SH2 (*Src Homology 2 domain*) Dominio tridimensionale di circa 100 aminoacidi presente in molte proteine coinvolte nella trasduzione del segnale, che permette interazioni specifiche non covalenti con le proteine che contengono fosfotirosine. Ogni dominio SH2 ha un'unica specificità di legame determinata dai residui aminoacidici adiacenti alla fosfotirosina sulla proteina bersaglio. Molte proteine coinvolte nelle fasi precoci della trasduzione del segnale nei linfociti T e B interagiscono attraverso i domini SH2.

Dominio SH3 (*Src Homology 3 domain*) Dominio tridimensionale di circa 60 aminoacidi presente in un elevato numero di proteine coinvolte nella trasduzione del segnale, che permette il legame proteina-proteina. I domini SH3 si legano ai residui di prolina e agiscono in cooperazione con i domini SH2 della stessa proteina. Per esempio, SOS, il fattore di scambio del nucleotide guanina per la Ras, contiene sia domini SH2 sia SH3, ed entrambi risultano coinvolti nel suo legame all'adattatore proteico Grb-2.

Dosaggio radioimmunologico (*RadioImmunoAssay*, RIA) Tecnica immunologica altamente sensibile e specifica per quantificare la concentrazione di un antigene in una soluzione; si basa sull'utilizzo di un anticorpo marcato radioattivamente specifico per l'antigene. In genere si utilizzano due anticorpi specifici per l'antigene. Il primo anticorpo non è marcato ma è fissato a un supporto solido su cui lega e si immobilizza l'antigene di cui deve essere determinata la concentrazione. La quantità del secondo anticorpo marcato che si lega all'antigene immobilizzato, misurata mediante appositi rilevatori di radioattività, è proporzionale alla concentrazione dell'antigene nella soluzione esaminata.

Ectoparassiti Parassiti che vivono all'esterno di un individuo, come le zecche e gli acari. L'immunità innata e quella specifica sono coinvolte nella protezione contro gli ectoparassiti, spesso distruggendoli allo stadio larvale.

Editing (riedizione) recettoriale Processo in seguito al quale alcuni linfociti B immaturi che riconoscono gli antigeni self nel midollo osseo possono essere indotti a modificare la specificità delle Ig espresse. L'editing recettoriale comporta la riattivazione dei geni *RAG*, una nuova ricombinazione dei segmenti V-J della catena leggera e la produzione di una nuova catena leggera che permette alla cellula di esprimere un nuovo BCR non reattivo contro il self.

Effetto citopatico dei virus Effetto dannoso dei virus sulle cellule dell'ospite provocato attraverso una serie di meccanismi biochimici o molecolari indipendenti dalla risposta immunitaria dell'ospite al virus. Alcuni virus hanno uno scarso effetto citopatico e la malattia che a essi si accompagna è dovuta alla risposta del sistema immunitario che riconosce e uccide le cellule infettate.

ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) Metodo per la quantificazione di un antigene immobilizzato su una superficie solida usando un anticorpo specifico accoppiato in modo covalente con un enzima. La quantità di anticorpo che lega l'antigene è proporzionale alla quantità di antigene presente ed è determinata mediante la misurazione spettrofotometrica della reazione di conversione di un substrato incolore a un prodotto colorato catalizzata dall'enzima accoppiato. (Vedi l'Appendice IV).

Elminta Verme parassita. Le infezioni da elminti spesso suscitano risposte T_H2 con infiltrati infiammatori caratterizzati dalla presenza di numerosi eosinofili e produzione di IgE.

Ematopoiesi Sviluppo di cellule ematiche mature, compresi eritrociti, leucociti e piastrine, a partire da cellule staminali pluripotenti del midollo osseo e del fegato fetale. L'emopoiesi è regolata da numerose citochine prodotte dalle cellule stromali del midollo osseo, dai linfociti T e da altri tipi cellulari.

Encefalomielite autoimmune sperimentale (EAS) Modello animale di sclerosi multipla, patologia autoimmune demielinizzante del sistema nervoso centrale. Viene indotta sperimentalmente nel topo mediante l'immunizzazione con componenti della guaina mielinica nervosa (come la proteina basica della mielina) in presenza di un adiuvante. La malattia è mediata in larga parte dai linfociti T $CD4^+$ secernenti citochine e specifici per componenti della guaina mielinica.

Endosoma Vescicola intracellulare delimitata da una membrana in cui le proteine extracellulari sono internalizzate durante l'elaborazione dell'antigene. Gli endosomi hanno un pH acido e contengono enzimi proteolitici che degradano le proteine in peptidi, i quali si legano alle molecole MHC di classe II. Un sottogruppo di endosomi ricchi di molecole MHC di classe II, detti MIIC, svolge un ruolo speciale nell'elaborazione e nella presentazione dell'antigene attraverso la via di classe II.

Endotossina Componente della parete cellulare dei batteri Gram-negativi rilasciata da batteri uccisi e in grado di stimolare le risposte infiammatorie immunitarie innate legandosi a TLR4 su diversi tipi cellulari, inclusi i fagociti, le cellule endoteliali, le cellule dendritiche e le cellule della barriera epiteliale. L'endotossina, detta anche lipopolisaccaride (LPS), è formata da una componente lipidica e da una porzione polisaccaridica.

Enhancer Sequenza nucleotidica regolatrice in un gene, localizzata a monte o a valle del promotore, che lega i fattori di trascrizione e aumenta l'attività del promotore. Nelle cellule del sistema immunitario, gli enhancer sono responsabili dell'integrazione dei segnali cellulari di superficie che portano all'induzione della trascrizione di geni che codificano per la maggior parte delle proteine effettrici della risposta immune, come le citochine.

Eosinofilo Granulocita di origine midollare abbondante negli infiltrati infiammatori delle reazioni di fase tardiva dell'ipersensibilità immediata e che contribuisce a molti fenomeni patologici delle malattie allergiche. Gli eosinofili sono importanti nella difesa contro i parassiti extracellulari, come gli elminti.

Epitopo Regione specifica di un antigene macromolecolare riconosciuta dall'anticorpo. Nel caso di un antigene proteico riconosciuto da un linfocita T, un epitopo è la porzione peptidica complessata a una molecola MHC per il riconoscimento da parte del TCR. È sinonimo di determinante.

Epitopo immunodominante L'epitopo di un antigene proteico che induce maggiormente la risposta in un individuo immunizzato con la proteina nativa. Gli epitopi immunodominanti corrispondono ai peptidi generati per proteolisi dalle APC che si legano con maggiore avidità alle molecole MHC e che hanno una maggiore probabilità di stimolare i linfociti T.

Esclusione allelica Espressione di uno solo dei due alleli che codificano per le catene leggere o pesanti delle immunoglobuline o la catena β del recettore del linfocita T. L'esclusione allelica si verifica quando la proteina prodotta per ricombinazione di un gene per il recettore per l'antigene su di un cromosoma blocca il riarrangiamento del locus corrispondente sull'altro cromosoma. Questa proprietà assicura che ogni linfocita esprima soltanto un recettore per l'antigene.

Espansione clonale L'aumento di ~10.000 fino a 100.000 volte del numero di linfociti specifici verso un determinato antigene che fa seguito alla stimolazione e proliferazione di un linfocita T naïve. L'espansione clonale ha luogo nei tessuti linfoidi secondari ed è indispensabile affinché, a partire da un limitato numero di precursori specifici, venga generata una popolazione sufficientemente numerosa di cellule effettrici deputate all'eradicazione delle infezioni.

Estravasazione Perdita nei tessuti di liquidi e componenti cellulari del sangue.

FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorter*) Separatore di cellule attivato dalla fluorescenza Derivato dal citometro a flusso, il FACS è uno strumento che viene usato per la purificazione di determinate cellule da una popolazione eterogenea in base alla loro capacità di legare una sonda fluorescente specifica. La popolazione cellulare è dapprima marcata con una sonda fluorescente, come per esempio un anticorpo specifico per un antigene di superficie espresso dal tipo cellulare che si vuole purificare. Le cellule vengono quindi fatte passare una alla volta attraverso un fluorimetro dotato di raggio laser incidente e deviate in differenti provette di raccolta da un campo elettromagnetico, la cui forza e direzione variano a seconda dell'intensità del segnale fluorescente. Le cellule riconosciute dalla sonda fluorescente vengono pertanto separate e purificate dal resto della popolazione cellulare.

Fagociti mononucleati Cellule derivate da un progenitore midollare comune, la cui principale funzione è la fagocitosi. Queste cellule agiscono come APC nelle fasi di riconoscimento e attivazione della risposta immunitaria acquisita e come cellule effettrici nell'immunità innata e acquisita. I fagociti mononucleati circolano nel sangue in forma non completamente differenziata come monociti, per poi differenziarsi in macrofagi una volta migrati nei tessuti.

Fagocitosi Processo attraverso il quale determinate cellule del sistema immunitario innato, come i macrofagi e i neutrofili, inglobano grandi particelle (>0,5 μm di diametro), per esempio microrganismi intatti. La cellula circonda la particella emettendo estroflessioni della sua membrana plasmatica attraverso un processo che richiede energia e modificazioni del citoscheletro e che porta alla formazione di una vescicola intracellulare, detta fagosoma, che contiene la particella ingerita.

Fagosoma Vescicola intracellulare circondata da una membrana che contiene microbi o materiale particolato inglobato dall'ambiente extracellulare. I fagosomi si formano durante il processo di fagocitosi e si fondono con altre strutture vescicolari, come i lisosomi, portando alla degradazione enzimatica del materiale ingerito.

Famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G Famiglia eterogenea di recettori per gli ormoni, mediatori di natura lipidica dei processi infiammatori, e per le chemochine, che per la loro trasduzione del segnale si associano a proteine G trimeriche.

Fas (CD95) Recettore di morte cellulare, membro della famiglia dei recettori per il fattore di necrosi tumorale (TNF), espresso sulla membrana dei linfociti T e di molti altri tipi cellulari. La sua occupazione determina l'attivazione di una via di trasduzione del segnale che induce l'apoptosi della cellula. La via di morte è innescata quando Fas si lega al suo ligando (FasL) espresso sui linfociti T attivati. L'uccisione dei linfociti T mediata da Fas, detta morte cellulare indotta da attivazione, è importante per il mantenimento della tolleranza al self. Mutazioni nel gene *FAS* causano malattie autoimmuni sistemiche in modelli murini e nell'uomo (vedi anche **Recettori di morte cellulare**).

Fase effettrice Fase di una risposta immunitaria che segue quelle di riconoscimento e attivazione; durante questa fase un microbo o una tossina sono distrutti o inattivati. Per esempio, in una risposta immunitaria umorale la fase effettrice può essere caratterizzata dall'attivazione del complemento dipendente dagli anticorpi e dalla fagocitosi dei batteri opsonizzati dagli anticorpi e/o dal complemento.

Fattore-α di necrosi tumorale (*Tumor Necrosis Factor-α*, TNF-α) Citochina prodotta prevalentemente dai fagociti mononucleati attivati, che agisce stimolando il reclutamento dei neutrofili e dei monociti nel focolaio infiammatorio e aumentando il loro potere battericida. Il TNF induce l'espressione di molecole di adesione nell'endotelio vascolare e la secrezione di chemochine da parte dei macrofagi e delle cellule endoteliali. Nelle infezioni gravi, il TNF è prodotto in quantità molto elevate e svolge effetti sistemici, tra cui l'induzione di febbre, la sintesi

di proteine di fase acuta da parte del fegato e la cachessia. La produzione di quantità molto elevate di TNF può provocare inoltre trombosi intravascolare e shock.

Fattore autocrino Molecola che agisce sulla stessa cellula che la produce. Per esempio, l'IL-2 è un fattore di crescita autocrino dei linfociti T, che stimola l'attività mitotica delle cellule che la producono.

Fattore-β di crescita trasformante (*Transforming Growth Factor-β*, TGF-β) Citochina prodotta dai linfociti T attivati, dai fagociti mononucleati e da altre cellule, le cui attività principali sono l'inibizione della proliferazione e della differenziazione dei linfociti T, l'inibizione dell'attivazione dei macrofagi e il controbilanciamento degli effetti delle citochine proinfiammatorie.

Fattore di attivazione piastrinica (*Platelet-Activating Factor*, PAF) Mediatore lipidico prodotto in vari tipi cellulari, come i mastociti e le cellule endoteliali, attraverso il metabolismo dei fosfolipidi di membrana. Il PAF induce broncocostrizione, vasodilatazione ed edema e può essere un importante mediatore nell'asma.

Fattore nucleare *κB* (*Nuclear Factor-κB*, NF-κB) Famiglia di fattori trascrizionali composta da omodimeri o eterodimeri delle proteine omologhe alla proteina c-Rel. Le proteine NF-κB sono necessarie per la trascrizione inducibile di numerosi geni importanti nell'immunità innata e acquisita.

Fattore nucleare delle cellule T attivate (*Nuclear Factor of Activated T cells*, NFAT) Fattore di trascrizione necessario per l'espressione dei geni dell'IL-2, dell'IL-4, del TNF e di altre citochine. Vi sono quattro differenti NFAT, ciascuno codificato da un gene distinto; NFAT1 e NFAT4 sono espressi nei linfociti T. Le molecole citoplasmatiche di NFAT sono attivate in seguito a defosforilazione $Ca2^{+}$-calmodulina-dipendente mediata dalla calcineurina, questo consente alle molecole di NFAT di traslocare nel nucleo e legare, in genere in associazione con altri fattori trascrizionali, come AP-1, sequenze consenso nelle regioni regolatrici dei geni delle citochine.

Fattore paracrino Molecola che agisce sulle cellule presenti nelle immediate vicinanze della cellula che produce il fattore stesso. Molte citochine agiscono con modalità paracrina.

Fattore stimolante le colonie di granulociti (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*, G-CSF) Citochina prodotta da linfociti T attivati, macrofagi e cellule endoteliali nelle sedi di infezione; agisce sul midollo osseo aumentando la produzione e la mobilizzazione dei neutrofili per rimpiazzare le perdite di granulociti nel corso della reazione infiammatoria.

Fattore stimolante le colonie di granulociti e monociti (*Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor*, GM-CSF) Citochina prodotta da linfociti T attivati, macrofagi, cellule endoteliali e fibroblasti stromali che agisce sul midollo osseo per aumentare la produzione di neutrofili e monociti. GM-CSF è inoltre un fattore di attivazione dei macrofagi e promuove la maturazione delle cellule dendritiche.

Fattori regolatori dell'interferone (*Interferon Regulatory Factors*, IRF) Famiglia di fattori di trascrizione inducibili, importanti per l'espressione dell'infiammazione e dei geni antivirali. Per esempio, IRF3 è attivato da segnali dei TLR e regola l'espressione degli interferoni di tipo I, che sono citochine che proteggono le cellule dalle infezioni virali.

Fattori stimolanti la formazione di colonie (*Colony-Stimulating Factors*, CSF) Citochine che favoriscono l'espansione e la differenziazione delle cellule progenitrici nel midollo osseo. I CSF sono essenziali per la maturazione di eritrociti, granulociti, monociti e linfociti. Esempi di CSF sono il fattore di stimolazione delle colonie di granulociti-monociti (GM-CSF), il fattore di stimolazione delle colonie di granulociti (G-CSF) e l'IL-3.

Feedback anticorpale Modulazione negativa della produzione di anticorpi da parte delle IgG secrete; si verifica quando i complessi antigene-anticorpo impegnano simultaneamente i recettori Ig e un

tipo di recettore Fcγ (FcγRIIb) sulla membrana dei linfociti B. In queste condizioni, la coda citoplasmatica di FcγRIIb trasduce segnali inibitori all'interno del linfocita B.

Ficoline Proteine plasmatiche esameriche del sistema immunitario innato, contengono domini simili al collageno e al fibrinogeno e domini in grado di riconoscere i carboidrati. Si legano alla parete dei batteri Gram-positivi, li opsonizzano e attivano il complemento.

Fitoemoagglutinina (*PhytoHemAgglutinin*, PHA) Proteina polimerica legante i carboidrati (lectina), prodotta da alcuni tipi di piante e capace di indurre l'aggregazione di molecole di superficie dei linfociti T umani, compreso il TCR, inducendo pertanto l'attivazione e l'agglutinazione dei linfociti T. Grazie alla sua capacità di attivare tutti i linfociti T, indipendentemente dalla loro specificità antigenica, la PHA è considerata un attivatore policlonale. È utilizzata per valutare se i linfociti T di un paziente sono funzionali o per indurre la mitosi dei linfociti T per la tipizzazione del cariotipo.

FK506 Farmaco immunosoppressore (conosciuto anche con il nome di tacrolimus) usato per prevenire il rigetto di un allotrapianto che, analogamente alla ciclosporina, agisce bloccando la trascrizione delle citochine nei linfociti T. L'FK-506 lega una proteina citosolica definita FK-506BP (*FK-506-Binding Protein*) e questo complesso si lega alla calcineurina, inibendo l'attivazione e la traslocazione al nucleo del fattore NFAT.

Flogosi immunitaria Processo infiammatorio che deriva dall'attivazione dell'immunità specifica a opera di un antigene. L'infiltrato cellulare presente nel focolaio infiammatorio comprende le cellule dell'immunità innata, come i neutrofili e i macrofagi, che sono state reclutate dalle citochine prodotte dai linfociti T.

Follicolo linfatico Regione di un organo linfoide periferico, come i linfonodi e la milza, ricco di linfociti B e sede della loro proliferazione e differenziazione indotte dall'antigene. Nel corso delle risposte T-dipendenti dei linfociti B ad antigeni proteici all'interno dei follicoli si forma un centro germinativo.

Fosfatasi Enzima che rimuove gruppi fosforici dalle catene laterali di determinati residui aminoacidici delle proteine. Le fosfatasi dei linfociti, quali CD45 o la calcineurina, regolano l'attività di varie molecole di trasduzione del segnale e fattori di trascrizione. Alcune fosfatasi possono essere specifiche per residui di fosfotirosina e altre per residui di fosfoserina e fosfotreonina.

Fosfolipasi Cγ (PLCγ1) Enzima che catalizza l'idrolisi del fosfolipide di membrana plasmatica fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2), generando due molecole coinvolte nella trasduzione del segnale, inositolo-1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerolo. PLCγ1 è attivata nei linfociti in seguito al legame del recettore per l'antigene con il suo ligando.

FoxP3 Fattore di trascrizione della famiglia dei "forkhead" espresso dai linfociti T CD4 regolatori e cruciale per il loro sviluppo. Mutazioni di FoxP3 nel topo e nell'uomo portano all'assenza di linfociti T regolatori $CD25^+$ e a disordini autoimmuni multisistemici.

Frammento $F(ab')_2$ Frammento proteolitico di una molecola IgG che comprende due intere catene leggere, ma soltanto il dominio variabile, il primo dominio costante e la regione cerniera delle due catene pesanti. I frammenti $F(ab')_2$ mantengono l'intera regione bivalente di legame con l'antigene della molecola IgG intatta, ma non possono legare il complemento o i recettori per Fc. Sono usati in ricerca e nelle applicazioni terapeutiche in cui si desidera mantenere la capacità dell'anticorpo di legare l'antigene in assenza di funzioni effettrici.

Frammento Fab Frammento proteolitico di una molecola IgG che comprende un'intera catena leggera accoppiata a un frammento di catena pesante contenente solo il dominio variabile e il primo dominio costante. Frammenti Fab conservano la capacità di legare l'antigene, ma non possono interagire con i recettori per Fc o con il complemento. Pertanto, preparazioni di frammenti Fab sono utilizzate sperimentalmente e nella pratica clinica quando si desidera legare

un antigene senza attivare le funzioni effettrici proprie di un anticorpo. (Un frammento Fab mantiene anche la regione cerniera della catena pesante.)

Frammento Fc (frammento cristallizzabile) Frammento proteolitico di un anticorpo che contiene solo le regioni carbossiterminali delle due catene pesanti legate con ponti disolfuro. La regione Fc media funzioni effettrici legandosi ai recettori per Fc della superficie cellulare dei fagociti e delle cellule NK o alla proteina del complemento C1 (i frammenti Fc sono così chiamati in quanto tendono facilmente a cristallizzare).

GATA-3 Fattore di trascrizione che promuove la differenziazione dei linfociti T naïve in linfociti T_H2.

Geni della risposta immunitaria (Ir) Originariamente furono definiti in ceppi inbred come geni ereditati con modalità mendeliana dominante che controllano la capacità di produrre anticorpi verso polipeptidi sintetici di semplice struttura. Oggi sappiamo che i geni Ir sono geni polimorfi che codificano per le molecole MHC di classe II che presentano peptidi ai linfociti T e sono quindi necessari per l'attivazione dei linfociti T e per le risposte T helper-dipendenti dei linfociti B (anticorpi) agli antigeni proteici.

Glicoproteina dell'envelope (Env) Glicoproteina di membrana codificata da un retrovirus ed espressa sulla membrana plasmatica delle cellule infettate e sull'involucro esterno dei virioni, derivante dalla cellula ospite. Le proteine Env sono spesso necessarie per l'infettività virale. Le proteine Env del virus dell'immunodeficienza umana (HIV) comprendono la gp41 e la gp120 che si legano a CD4 e ai recettori per le chemochine espressi dai linfociti T umani, mediando la fusione della membrana virale con la membrana plasmatica linfocitaria.

Glomerulonefrite Infiammazione dei glomeruli renali, spesso innescata da meccanismi immunopatologici, quali la deposizione sulla membrana basale glomerulare di complessi circolanti antigene-anticorpo o il legame degli autoanticorpi ad antigeni espressi nel glomerulo. Gli anticorpi possono attivare il complemento e i fagociti e la conseguente risposta infiammatoria può portare a insufficienza renale.

Grande linfocita granulare Altro nome per definire una cellula NK che si basa sulla morfologia di tale tipo cellulare nel sangue.

Granuloma Nodulo di tessuto infiammatorio formato da aggregati di macrofagi attivati e linfociti T, generalmente associato a fenomeni di fibrosi. L'infiammazione granulomatosa è una forma di ipersensibilità cronica di tipo ritardato, spesso in risposta a microbi persistenti, come *Mycobacterium tuberculosis* o alcuni funghi, o in risposta ad antigeni corpuscolati non facilmente fagocitabili.

Granzima Enzima serinproteasico presente nei granuli dei CTL e delle cellule NK; viene liberato per esocitosi e penetra nelle cellule bersaglio attraverso i "fori" della membrana cellulare creati principalmente dalla perforina. Una volta internalizzato, l'enzima scinde proteoliticamente le caspasi, attivandole; le caspasi a loro volta scindono diversi substrati, inducendo l'apoptosi delle cellule bersaglio.

Gruppi sanguigni AB0 Antigeni carboidrati legati principalmente a proteine di superficie o lipidi presenti su diverse popolazioni cellulari, inclusi i globuli rossi. Tali antigeni differiscono tra diversi individui a seconda degli alleli ereditati che codificano gli enzimi richiesti per la sintesi dei relativi antigeni. Gli antigeni AB0 si comportano da alloantigeni e sono responsabili delle reazioni trasfusionali e del rigetto iperacuto degli allotrapianti.

Gruppi sanguigni Rh Complesso sistema di alloantigeni proteici espressi sulla membrana degli eritrociti che sono causa di reazioni trasfusionali e della malattia emolitica del neonato. L'antigene Rh clinicamente più importante è chiamato D.

HAART Vedi **Terapia antiretrovirale altamente attiva**.

HLA (*Human Leukocyte Antigen*) Molecole MHC espresse sulla superficie delle cellule umane. Furono inizialmente identificate come alloantigeni espressi sulla superficie dei leucociti, riconosciuti da anticorpi presenti nel siero di individui precedentemente esposti a tali cellule (per esempio madri plurigravide o riceventi di trasfusioni sanguigne). (Vedi anche **Molecola del complesso maggiore di istocompatibilità [MHC].)**

HLA-DM (detta anche DM) Molecola scambiatrice di peptidi che svolge un ruolo critico nella via di presentazione dell'antigene delle molecole MHC di classe II. HLA-DM si ritrova in un compartimento endosomiale specializzato (denominato MIIC) e facilita la rimozione del peptide CLIP derivante dalla digestione della catena invariante γ in modo che i peptidi antigenici possano occupare la tasca delle molecole MHC di classe II. L'HLA-DM è codificata da un gene situato nell'MHC ed è strutturalmente simile alle molecole MHC di classe II, ma non è polimorfa. Nel topo è chiamata H-2M.

Homing linfocitario Migrazione direzionale di sottogruppi di linfociti circolanti in particolari sedi tissutali. L'homing linfocitario è regolato dall'espressione selettiva di recettori di adesione sui linfociti, detti recettori di homing, e dall'espressione tessuto-specifica dei ligandi endoteliali per tali recettori, detti addressine, in differenti letti vascolari. Per esempio, alcuni linfociti T si indirizzano preferenzialmente al tessuto linfoide intestinale (come le placche di Peyer) in maniera regolata dal legame della $\alpha_4\beta_1$ espressa dai linfociti T con l'addressina MAdCAM (*Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule*) presente sull'endotelio delle placche di Peyer.

Ibridoma Linea cellulare generata per fusione cellulare o ibridazione somatica tra un linfocita normale e una linea tumorale linfocitaria immortalizzata. Gli ibridomi B, generati per fusione dei linfociti B normali di una data specificità antigenica con una linea di mieloma, sono usati per la produzione di anticorpi monoclonali. Gli ibridomi T, generati per fusione di un linfocita T normale di una certa specificità con una linea tumorale T, sono abitualmente utilizzati a scopo di ricerca.

Idiotipo Differenze presenti nelle regioni variabili degli anticorpi, localizzate nelle CDR e che determinano la specificità di legame dell'anticorpo. Anticorpi con lo stesso idiotipo possono dunque legarsi in modo specifico, ad alta affinità, al medesimo epitopo antigenico complementare.

Igα/Igβ Proteine β necessarie per l'espressione delle Ig sulla membrana dei linfociti B e per la trasduzione del segnale da esse generato. L'Igα e l'Igβ si legano tra loro mediante ponti disolfuro e sono associate non covalentemente con la coda citoplasmatica delle Ig di membrana, formando il complesso recettoriale per l'antigene del linfocita B. I domini citoplasmatici delle due molecole contengono motivi ITAM che sono coinvolti negli eventi precoci di trasduzione del segnale durante l'attivazione dei linfociti B indotta dall'antigene.

Ignoranza clonale Forma di non responsività linfocitaria in cui gli antigeni autologhi sono "ignorati" dal sistema immunitario, sebbene i linfociti specifici per quegli antigeni siano vitali e funzionali.

Immunità Protezione contro patologie, generalmente infettive, mediata da cellule e tessuti complessivamente detti sistema immunitario. In senso più ampio, l'immunità si riferisce alla capacità di rispondere a sostanze estranee, come microbi e molecole non infettive.

Immunità adattativa Forma di immunità (definita anche acquisita o specifica) mediata dai linfociti e stimolata dall'esposizione ad agenti infettivi. Contrariamente all'immunità innata, l'immunità adattativa è caratterizzata da una straordinaria specificità di riconoscimento delle macromolecole e dalla "memoria", cioè la capacità di rispondere più vigorosamente a esposizioni successive allo stesso microbo. L'immunità adattativa è anche chiamata immunità specifica o acquisita.

Immunità attiva Forma di immunità specifica indotta dall'esposizione a un antigene estraneo e dall'attivazione dei linfociti, in cui l'individuo immunizzato svolge un ruolo attivo nella risposta all'antigene. Vedi anche **Immunità passiva**.

Immunità cellulo-mediata Forma di immunità specifica mediata dai linfociti T che funge da meccanismo di difesa contro vari tipi di microrganismi che sono inglobati dai fagociti o che infettano cellule non fagocitiche. Le risposte immunitarie cellulo-mediate comprendono l'attivazione dei fagociti, mediata dai linfociti T $CD4^+$, e l'uccisione delle cellule infettate, mediata dai linfociti citotossici $CD8^+$ (CTL).

Immunità innata Protezione contro le infezioni basata su meccanismi preesistenti all'infezione stessa, capaci di risposte rapide ai microrganismi e che reagiscono essenzialmente in maniera simile in caso di infezioni ripetute. Il compartimento innato del sistema immunitario comprende le barriere epiteliali, i fagociti (neutrofili, macrofagi), le cellule NK, il sistema del complemento e le citochine. Queste ultime sono in gran parte prodotte dai fagociti mononucleati e dalle cellule dendritiche che regolano e coordinano molte attività delle cellule dell'immunità innata.

Immunità mucosale Forma di immunità protettiva che agisce a livello delle superfici mucose del tratto gastrointestinale e del tratto respiratorio per impedire la colonizzazione da parte di microrganismi ingeriti o inalati. La secrezione di IgA è una componente importante dell'immunità mucosale.

Immunità neonatale Immunità umorale passiva alle infezioni presente nei mammiferi durante i primi mesi di vita, prima dello sviluppo completo del sistema immunitario. L'immunità neonatale è mediata da anticorpi prodotti dalla madre che sono trasportati prima della nascita nel circolo fetale attraverso la placenta o sono derivati dal latte ingerito e trasportati attraverso l'epitelio intestinale.

Immunità passiva Forma di immunità a un antigene stabilita in un individuo grazie al trasferimento di anticorpi o linfociti da un altro individuo che è immune per tale antigene. Il ricevente di un tale trasferimento può divenire immune all'antigene senza essere mai entrato in contatto con esso. Un esempio di immunità passiva è il trasferimento in un individuo non immunizzato di siero contenente anticorpi specifici rivolti contro determinate tossine microbiche o veleni di serpente. Vedi anche **Immunità attiva**.

Immunità specifica Vedi **Immunità adattativa**.

Immunità tumorale Protezione mediata dal sistema immunitario contro lo sviluppo o la progressione dei tumori. Sebbene le risposte immunitarie ai tumori che si verificano naturalmente possano essere dimostrate frequentemente, i tumori spesso evadono queste risposte. Le nuove terapie che hanno come bersaglio le molecole inibitorie espresse dai linfociti T, come PD-1, si sono dimostrate efficaci nel migliorare l'immunità anti-tumorale mediata dai linfociti T effettori.

Immunità umorale Tipo di risposta immunitaria specifica mediata da anticorpi prodotti dai linfociti B. L'immunità umorale è il principale meccanismo di difesa contro microrganismi extracellulari e le loro tossine.

Immunoblot Tecnica analitica che utilizza gli anticorpi per rilevare la presenza di un antigene precedentemente legato a una matrice solida, come un filtro di carta (conosciuta anche con il nome di Western blot).

Immunocomplesso Complesso composto da una o più molecole anticorpali legate all'antigene. I complessi immuni possono avere dimensioni estremamente variabili, poiché ogni molecola di anticorpo possiede almeno due siti di legame per l'antigene e molti antigeni contengono epitopi multipli. I complessi immuni attivano meccanismi effettori dell'immunità umorale, come la via classica del complemento e l'attivazione dei fagociti mediata dal recettore per Fc. La deposizione di complessi immuni circolanti sulle pareti di vasi sanguigni, glomeruli renali e sinovie articolari può scatenare una risposta infiammatoria e una malattia.

Immunodeficienza acquisita Deficit nel sistema immunitario acquisito dopo la nascita e causato da infezioni, malnutrizione o terapie che provocano la deplezione delle cellule immunitarie; non è correlato ad alcun difetto genetico. È detta anche **immunodeficienza secondaria**.

Immunodeficienza congenita Difetto genetico che causa una deficienza in alcune componenti del sistema immunitario innato o specifico e che determina un'aumentata suscettibilità alle infezioni. L'immunodeficienza congenita si manifesta nella prima infanzia, ma talvolta si rivela in età più avanzata. È detta anche immunodeficienza primaria.

Immunodeficienza primaria Vedi **Immunodeficienza congenita**.

Immunodeficienza secondaria Vedi **Immunodeficienza acquisita**.

Immunodeficienza Vedi **Immunodeficienza acquisita** e **Immunodeficienza congenita**.

Immunodeficienze combinate gravi (*Severe Combined Immunodeficiency*, SCID) Malattie da immunodeficienza in cui non si sviluppano o non funzionano correttamente né i linfociti B né i linfociti T; risultano quindi compromesse sia l'immunità umorale sia l'immunità cellulo-mediata. I bambini con SCID, in genere, durante il primo anno di vita sono soggetti a infezioni, che sono letali in assenza di un adeguato trattamento. Esistono numerose cause genetiche di SCID.

Immunofluorescenza Tecnica mediante la quale una molecola viene identificata utilizzando un anticorpo marcato con un fluorocromo. Per esempio, le cellule che esprimono un particolare antigene di superficie possono essere colorate con un anticorpo coniugato con fluoresceina specifico per quell'antigene e visualizzate mediante un microscopio a fluorescenza.

Immunogeno Antigene che induce una risposta immunitaria. Non tutti gli antigeni sono immunogeni. Per esempio, i composti a basso peso molecolare (apteni) possono legarsi agli anticorpi ma stimolare una risposta solo se associati a macromolecole (proteine carrier).

Immunoglobulina Sinonimo di anticorpo (vedi **Anticorpo**).

Immunoistochimica Tecnica utilizzata per identificare la presenza di un antigene in sezioni istologiche di tessuto utilizzando un anticorpo specifico per tale antigene associato a un enzima. L'enzima converte un substrato incolore in una sostanza insolubile colorata che precipita nella sede in cui l'anticorpo (e quindi l'antigene) è localizzato. La localizzazione nelle sezioni di tessuto del precipitato colorato, e pertanto dell'antigene, è osservabile al microscopio ottico. L'immunoistochimica è una tecnica usata routinariamente in diagnostica anatomopatologica e in vari campi di ricerca.

Immunoperossidasi Comune tecnica immunoistochimica in cui un anticorpo coniugato a perossidasi di rafano è usato per evidenziare la presenza di un antigene in una sezione di tessuto. L'enzima perossidasi converte un substrato incolore in un prodotto bruno insolubile, osservabile al microscopio ottico.

Immunoprecipitazione Tecnica per l'isolamento di una molecola da una soluzione mediante il legame a un anticorpo; il complesso antigene-anticorpo viene quindi reso insolubile, sia mediante precipitazione tramite un secondo antianticorpo sia attraverso l'immobilizzazione del primo anticorpo con una particella o una biglia insolubile.

Immunosoppressione Inibizione di una o più componenti del sistema immunitario naturale o acquisito, in seguito a una malattia intercorrente o indotta intenzionalmente mediante farmaci, allo scopo di prevenire o curare il rigetto di trapianto o patologie autoimmuni. Un farmaco immunosoppressore comunemente utilizzato è la ciclosporina, che blocca la produzione di citochine da parte dei linfociti T.

Immunoterapia Trattamento di una malattia attraverso l'impiego di agenti terapeutici che favoriscono la risposta immunitaria. L'immunoterapia oncologica, per esempio, cerca di promuovere risposte immunitarie attive contro gli antigeni tumorali o di stabilire un'immunità passiva mediante la somministrazione di anticorpi o linfociti T ad azione antitumorale.

Immunotossine Reagenti che possono essere utilizzati nella terapia antitumorale; sono formati da una potente tossina cellulare, come la ricina o la tossina difterica, coniugata covalentemente con anticorpi specifici per antigeni espressi sulla superficie delle cellule tumorali. L'obiettivo è sviluppare reagenti che possano indirizzarsi specificamente verso le cellule tumorali uccidendole,

senza danneggiare le cellule normali; purtroppo a tutt'oggi non sono ancora state sviluppate immunotossine sicure ed efficaci.

Infiammazione Complessa reazione del compartimento innato del sistema immunitario che comporta l'accumulo e l'attivazione di leucociti e proteine plasmatiche nelle sedi di infezione, o di danno cellulare. L'infiammazione è scatenata da alterazioni dell'endotelio dei vasi sanguigni che favoriscono il reclutamento leucocitario. Risposte immunitarie specifiche locali possono promuovere l'infiammazione. Nonostante l'infiammazione svolga una funzione protettiva nel controllare le infezioni e promuovere la riparazione dei tessuti, essa può anche essere causa di danno tissutale e malattia.

Inflammosoma Complesso multiproteico citoplasmatico dei fagociti mononucleati, cellule dendritiche e altri tipi cellulari che genera per proteolisi la forma attiva dell'IL-1β a partire da un precursore inattivo pro-IL-1β. La formazione del complesso dell'inflammosoma, che include NLRP3 (un recettore di NOD-simile) e la caspasi 1, è stimolata da numerosi prodotti microbici, molecole associate al danno cellulare e cristalli.

Inibitore di C1 (C1 INH) Proteina plasmatica che inibisce la via classica di attivazione del complemento. Il C1 INH è un inibitore delle proteasi seriniche (serpina) che mima i normali substrati delle componenti C1r e C1s del complemento. Un deficit genetico di C1 INH causa una malattia ereditaria chiamata edema angioneurotico congenito.

Integrine Proteine di membrana eterodimeriche le cui funzioni principali sono di mediare l'adesione delle cellule ad altre cellule o alla matrice extracellulare. Le integrine sono importanti per le interazioni dei linfociti T con le APC e per la migrazione dei leucociti dal sangue nei tessuti. L'interazione delle integrine leucocitarie con i loro ligandi viene modulata da segnali indotti dal legame delle chemochine ai rispettivi recettori. Due importanti integrine nel sistema immunitario sono VLA-4 (*Very Late Antigen 4*) e LFA-1 (*Leukocyte Function-associated Antigen 1*).

Interferoni Sottogruppo di citochine originariamente chiamati così per la loro capacità di interferire con le infezioni virali ma che hanno anche altre importanti funzioni immunomodulatrici. Gli interferoni di tipo I includono l'interferone α e l'interferone β, aventi la funzione di prevenire la replicazione virale nelle cellule. L'interferone di tipo II, detto anche interferone γ attiva i macrofagi e altri tipi di cellule. (Vedi l'Appendice II.)

Interleuchine Citochine, chiamate con un suffisso numerico, approssimativamente in base all'ordine temporale di scoperta o caratterizzazione molecolare (per esempio IL-1, IL-2). Alcune citochine furono originariamente identificate sulla base della loro funzione biologica, non vengono quindi chiamate con il nome di citochina. (Vedi l'Appendice II.)

Ipermutazione somatica Mutazioni puntiformi che si verificano con elevatissima frequenza a livello dei geni delle catene leggere e pesanti delle Ig nei linfociti B del centro germinativo in risposta ai segnali dalle cellule T_{FH}. Le mutazioni che portano all'espressione di anticorpi con aumentata affinità per l'antigene forniscono un vantaggio selettivo di sopravvivenza ai linfociti B che li producono, provocando la maturazione dell'affinità della risposta umorale.

Ipersensibilità da contatto Uno stato di responsività immunitaria a certi agenti chimici che induce reazioni di ipersensibilità di tipo ritardato mediate da linfociti T in seguito al contatto con la cute. Le sostanze chimiche che evocano tale reazione, inclusi gli ioni di nickel e l'urusciolo (sostanza oleosa presente nella linfa di piante velenose appartenenti alla famiglia delle *Anacardiaceae*), si legano e modificano proteine self presenti sulla membrana delle APC, rendendole così riconoscibili dai linfociti T $CD4^+$ o $CD8^+$.

Ipersensibilità immediata Tipo di reazione immunitaria responsabile delle malattie allergiche, che è causata dall'attivazione antigene dipendente dei mastociti tissutali rivestiti da Ig-E. I mastociti e i

basofili liberano i mediatori che causano aumento della permeabilità vascolare, vasodilatazione, contrazione della muscolatura liscia bronchiale e viscerale e infiammazione.

Ipersensibilità ritardata (*Delayed-Type Hypersensitivity*, DTH) Reazione immunitaria in cui l'attivazione macrofagica dipendente da linfociti T e l'infiammazione causano danno tissutale. Una reazione DTH all'iniezione sottocutanea di un antigene è spesso usata per saggiare la risposta immunitaria cellulo-mediata di un individuo (per esempio il test cutaneo con il derivato proteico purificato per saggiare lo stato di immunità nei confronti di *Mycobacterium tuberculosis*).

Ipotesi del doppio segnale Ipotesi, oggi dimostrata, la quale afferma che l'attivazione dei linfociti richiede due segnali distinti, il primo rappresentato dall'antigene e il secondo dai prodotti microbici o dai mediatori delle risposte innate ai microbi. La necessità di un antigene (segnale 1) assicura che la successiva risposta immunitaria sia specifica. La necessità di ulteriori stimoli innescati da microbi o da risposte innate (segnale 2) assicura che le risposte immunitarie si generino solo quando necessarie (ossia contro microbi o sostanze nocive) e non contro sostanze inoffensive come gli antigeni self. Il segnale 2 è spesso indicato con il termine "costimolazione".

Ipotesi della selezione clonale Caposaldo fondamentale del sistema immunitario (non più un'ipotesi) che afferma che ogni individuo possiede un numero elevatissimo di cloni linfocitari, ciascuno originato da un singolo precursore e in grado di riconoscere e rispondere a un singolo determinante antigenico. Quando un antigene penetra nell'organismo, si lega a uno specifico clone preesistente e lo attiva.

Isotipo Uno dei 5 tipi di anticorpo, determinato dalla presenza di una delle cinque differenti forme di catena pesante. Gli isotipi anticorpali comprendono IgM, IgD, IgG, IgA e IgE e ogni isotipo svolge una serie differente di funzioni effettrici. Ulteriori variazioni strutturali caratterizzano sottotipi distinti di IgG e IgA.

Istamina Amina vasoattiva, accumulata nei granuli dei mastociti, che rappresenta un mediatore chimico importante nelle reazioni di ipersensibilità immediata. L'istamina si lega a recettori specifici in vari tessuti e provoca l'aumento della permeabilità vascolare e la contrazione della muscolatura liscia bronchiale e intestinale.

ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) Motivo proteico conservato composto da due copie della sequenza aminoacidica tirosina-x-x-leucina (in cui x è un aminoacido qualunque) presente nella coda citoplasmatica di varie proteine di membrana del sistema immunitario coinvolte nella trasduzione del segnale. Gli ITAM sono presenti nelle proteine ζ e CD3 del complesso del TCR, nelle proteine Igα e Igβ nel complesso del BCR e nelle subunità coinvolte nella trasduzione del segnale di vari recettori Ig. Il legame di questi recettori a opera dei loro ligandi determina la fosforilazione dei residui di tirosina degli ITAM, formando siti di attacco per altre molecole coinvolte nell'amplificazione del segnale di attivazione cellulare.

ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*) Motivo di 6 aminoacidi (isoleucina-x-tirosina-x-x-leucina) presente nella coda citoplasmatica di vari recettori inibitori del sistema immunitario, come FcγRIIB sui linfociti B e il recettore inibente KIR sulle cellule NK. Quando tali recettori interagiscono con il loro ligando, gli ITIM sono fosforilati sui loro residui di tirosina, formando un sito di attacco per proteine tirosina-fosfatasi, che a loro volta agiscono inibendo altre vie di trasduzione del segnale.

Janus chinasi (JAK) Famiglia di tirosina-chinasi che si associano alle code citoplasmatiche di molti recettori per le citochine, come i recettori per l'IL-2, l'IL-4, l'IFN-γ, l'IL-12 e altri ancora. Il legame della citochina al recettore ne induce la dimerizzazione e la fosforilazione da parte di JAK; questo evento promuove il legame del fattore STAT e la sua fosforilazione sempre a opera di JAK, con la conseguente attivazione dello STAT. Diversi tipi di JAK si associano a diversi recettori per le citochine.

Lamina propria Strato di tessuto connettivo lasso sottostante l'epitelio nelle mucose, come l'intestino e le vie aeree, dove le cellule dendritiche, i mastociti, i linfociti e i macrofagi regolano la risposta immunitaria a organismi patogeni invasori.

Lck Tirosina chinasi non recettoriale della famiglia delle Src, espressa nei linfociti T dove si associa in modo non covalente con le code citoplasmatiche delle molecole CD4 e CD8; è implicata nell'attivazione delle cascate di trasduzione del segnale che portano all'attivazione dei linfociti T indotta da antigeni. Lck media la fosforilazione in tirosina delle code citoplasmatiche delle proteine CD3 e ζ del complesso recettoriale del linfocita T.

Lectina di tipo C Membro della grande famiglia di proteine che legano i carboidrati in modo calcio-dipendente, molte delle quali sono dotate di importanti funzioni nell'immunità innata e adattativa. Per esempio le lectine di tipo C solubili legano le strutture di carboidrati microbiche, causandone la fagocitosi o l'attivazione del complemento (per esempio, lectine leganti il mannosio, dectine, collectine, ficoline).

Lectina legante il mannosio (*Mannose-Binding Lectin*, MBL) Proteina plasmatica che lega i residui di mannosio presenti sulle pareti delle cellule batteriche e, agendo da opsonina, promuove la fagocitosi dei batteri da parte dei macrofagi. I macrofagi esprimono un recettore di membrana per il C1q che può anche legare la MBL ed è responsabile della captazione degli organismi opsonizzati.

Leishmania Parassita protozoo intracellulare obbligato che infetta i macrofagi e può causare una malattia infiammatoria cronica che interessa vari tessuti. L'infezione da *Leishmania* nel topo è servita da modello per lo studio delle funzioni effettrici di varie citochine e delle sottopopolazioni T helper che le producono. Le risposte T_H1 a *Leishmania major*, con conseguente produzione di IFN-γ, controllano l'infezione, mentre le risposte T_H2, caratterizzate dalla produzione di IL-4, portano alla sua disseminazione con esito letale.

Leucemia Neoplasia maligna dei precursori midollari delle cellule ematiche in cui solitamente un numero elevato di cellule leucemiche occupa il midollo osseo, penetrando spesso nel circolo sanguigno. Le leucemie linfocitiche derivano dai precursori dei linfociti B o T, le leucemie mielogene dai precursori dei granulociti o dei monociti, mentre le leucemie eritroidi dai precursori dei globuli rossi.

Leucocita polimorfonucleato (*PolyMorphoNuclear leukocyte*, PMN) Vedi **Neutrofilo**.

Leucotrieni Classe di mediatori lipidici dell'infiammazione derivati dall'acido arachidonico e prodotti dalla via della lipossigenasi in molti tipi cellulari. I mastociti producono elevate quantità di leucotriene C4 (LTC_4) che, insieme ai suoi prodotti di degradazione LTD_4 e LTE_4, lega recettori specifici sulle cellule muscolari lisce causando una prolungata broncocostrizione. I leucotrieni contribuiscono alla patologia dell'asma bronchiale. Nell'insieme, LTC_4, LTD_4 e LTE_4 rappresentano quel complesso di mediatori una volta noti come "sostanze a reazione lenta dell'anafilassi".

Ligando di c-Kit Proteina necessaria per l'emopoiesi, nelle prime fasi della maturazione dei linfociti T nel timo e nello sviluppo dei mastociti. Il ligando di c-Kit è prodotto dalle cellule stromali del midollo osseo e del timo, sia come proteina di membrana sia in forma solubile, e si lega al recettore tirosin chinasico c-Kit espresso dalle cellule staminali pluripotenti.

Ligando di Fas (FasL, CD95) Membro della famiglia del TNF, è espresso sulla membrana dei linfociti T attivati. FasL si lega al recettore di morte Fas, attivando in tal modo una via di trasduzione del segnale che induce la morte apoptotica della cellula esprimente Fas. Mutazioni nel gene *FasL*, così come mutazioni del gene *Fas*, causano nel topo patologie sistemiche autoimmuni.

Linfochina Vecchio nome attribuito alle citochine prodotte dai linfociti T. È attualmente noto che le stesse citochine possono essere prodotte da altri tipi cellulari.

Linfocita Tipo cellulare presente nel sangue, nei tessuti linfoidi e praticamente in tutti gli organi, che esprime recettori per l'antigene e media le risposte immunitarie. I linfociti comprendono le sottopopolazioni B e T (che partecipano all'immunità acquisita) e le cellule NK (che mediano alcune risposte immunitarie innate).

Linfocita B Il solo tipo cellulare in grado di produrre anticorpi e pertanto la componente cellulare centrale della risposta immunitaria umorale. I linfociti B si sviluppano nel midollo osseo e le cellule B mature si ritrovano principalmente nei follicoli linfoidi dei tessuti linfatici secondari, nel midollo osseo e in quantità ridotte anche nel sangue periferico.

Linfocita B immaturo Linfocita B IgM^+ IgD^-, appena derivato dai precursori midollari, incapace di proliferare o di differenziarsi in risposta all'antigene; può invece andare incontro a morte apoptotica o diventare funzionalmente inerte. I linfociti B immaturi specifici per gli antigeni self presenti nel midollo osseo sono selezionati negativamente dall'incontro con tali antigeni e non completano la loro maturazione.

Linfocita B maturo Linfocita B naïve funzionalmente competente che esprime IgM e IgD; rappresenta lo stadio finale di maturazione nel midollo osseo dei linfociti B che andranno a popolare gli organi linfoidi secondari.

Linfocita naïve (vergine) Un linfocita B o T maturo che non ha ancora incontrato un antigene e non costituisce la progenie di un linfocita maturo stimolato da un antigene. Quando i linfociti naïve sono attivati dall'antigene si differenziano in cellule effettrici, come i linfociti B secernenti anticorpi e i linfociti T effettori. I linfociti naïve esprimono marker di superficie e seguono vie di ricircolo che sono distinte da quelle dei linfociti attivati.

Linfocita pre-B Linfocita B in fase di maturazione presente solo nei tessuti emopoietici e caratterizzato dall'espressione di catene pesanti μ nel citoplasma, ma non di catene leggere. I recettori pre-B, formati dalla catena μ e dalla catena leggera sostitutiva invariabile, trasmettono segnali intracellulari che ne stimolano l'ulteriore maturazione in linfocita B immaturo.

Linfocita pre-CTL Linfocita T $CD8^+$ maturo, naïve, non ancora dotato di funzioni effettrici ma che, in seguito all'attivazione da parte di antigeni e molecole costimolatorie, si differenzia in CTL capace di lisare le cellule bersaglio e di produrre citochine.

Linfocita pre-T Linfocita T in via di sviluppo nel timo in uno stadio di maturazione caratterizzato dall'espressione della catena β del TCR, ma non della catena α, né di CD4 o CD8. Nei linfociti pre-T, la catena β del TCR è presente sulla superficie cellulare come parte del recettore pre-T.

Linfocita pro-B Linfocita in via di sviluppo nel midollo osseo che rappresenta la prima tappa verso la maturazione a linfocita B. I linfociti pro-B non producono immunoglobuline, ma possono essere distinti da altre cellule immature grazie all'espressione di marcatori di superficie specifici per lo stipite B, come CD19 e CD10.

Linfocita pro-T Linfocita T in via di sviluppo presente nella corticale del timo, appena giunto dal midollo osseo e che non esprime TCR, CD3, catena ζ, CD4 o CD8. I linfociti pro-T sono anche detti timociti doppio-negativi.

Linfocita T Cellula chiave che media le risposte immunitarie cellulo-mediate nell'ambito dell'immunità adattativa. I linfociti T maturano nel timo, circolano nel sangue, popolano i tessuti linfoidi secondari e sono reclutati nei focolai periferici di esposizione all'antigene. Essi esprimono recettori per l'antigene (TCR) che riconoscono frammenti peptidici di proteine estranee legati a molecole MHC self. Tra le sottopopolazioni di linfociti T ricordiamo i linfociti T helper $CD4^+$ e i linfociti T citotossici (CTL) $CD8^+$.

Linfocita T citotossico (o citolitico) (*Cytotoxic/cytolytic T Lymphocytes*, CTL) Tipo di linfocita T la cui principale funzione effettrice è riconoscere e distruggere le cellule infettate da virus o da altri microrganismi intracellulari. I CTL in genere esprimono CD8 e riconoscono peptidi microbici

presentati da molecole MHC di classe I sulla superficie della cellula infettata. L'uccisione delle cellule infettate avviene attraverso il rilascio del contenuto dei granuli citoplasmatici dei CTL nel citosol delle cellule bersaglio, causandone morte per apoptosi.

Linfocita T helper follicolare (*T Follicular Helper cells*, T_{FH}) Sottogruppo eterogeneo di linfociti $CD4^+$ helper presenti nei follicoli linfoidi, con la funzione di attivare le cellule B nel centro germinativo inducendo ipermutazione somatica, switch isotipico e la generazione di linfociti B della memoria e plasmacellule a lunga vita. I T_{FH} esprimono CXCR5, ICOS, IL-21 e Bcl-6.

Linfociti B della zona marginale Sottopopolazione di linfociti B che si trova esclusivamente nella zona marginale della milza. Queste cellule rispondono rapidamente agli antigeni di origine microbica presenti in circolo producendo anticorpi di tipo IgM caratterizzati da una limitata diversificazione antigenica.

Linfociti B-1 Sottopopolazione di linfociti B che nell'ontogenesi si sviluppa prima dei linfociti B convenzionali. Queste cellule esprimono un limitato repertorio di geni variabili e secernono anticorpi della classe IgM che legano antigeni T-indipendenti. Molti linfociti B-1 esprimono la molecola CD5 (Ly-1).

Linfociti della memoria Linfociti B o T che mediano risposte più rapide e potenti alla seconda e successive esposizioni allo stesso antigene (memoria). I linfociti B e T della memoria, prodotti tramite stimolazione antigenica dei linfociti naïve, sopravvivono in uno stato funzionalmente quiescente per molti anni dopo che l'antigene è stato eliminato.

Linfociti infiltranti i tumori (*Tumor-Infiltrating Lymphocytes*, TIL) Linfociti isolati dagli infiltrati infiammatori presenti nelle masse tumorali ottenute in seguito a resezione chirurgica, arricchiti in CTL specifici per il tumore e di cellule NK. Negli approcci di immunoterapia dei tumori, i TIL isolati da paziente con tumore sono fatti crescere *in vitro* in presenza di alte dosi di IL-2 e sono quindi reinoculati nel paziente.

Linfociti T γδ Sottopopolazione di linfociti T, abbondante negli epiteli, che esprimono una forma di TCR formata dalle catene γ e δ diversa dal più comune TCR αβ espresso dai linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$. Riconoscono i lipidi e gli altri antigeni non proteici di origine microbica.

Linfociti T helper Sottogruppo funzionale di linfociti T le cui principali funzioni effettrici sono l'attivazione dei macrofagi, la promozione dell'infiammazione nelle risposte immunitarie cellulo-mediate e la stimolazione della produzione di anticorpi da parte dei linfociti B nelle risposte immunitarie umorali. Queste funzioni effettrici dei linfociti T helper sono mediate dalla produzione di citochine e dall'espressione di CD40L che si lega a CD40 espresso dai macrofagi e dai linfociti B. La maggior parte dei linfociti T helper esprime la molecola CD4.

Linfociti T intraepiteliali Linfociti T presenti nell'epidermide e negli epiteli mucosi che tipicamente esprimono un repertorio estremamente limitato di recettori antigenici. Alcuni di questi linfociti, chiamati cellule NKT invarianti, possono riconoscere prodotti microbici, come glicolipidi, in associazione a molecole non polimorfe simili all'MHC di classe I. Altri, chiamati linfociti T γδ, riconoscono vari antigeni non-peptidici, non legati a molecole MHC. I linfociti T intraepiteliali possono essere considerati cellule effettrici dell'immunità innata e agiscono a difesa dell'ospite secernendo citochine, attivando fagociti e uccidendo le cellule infettate.

Linfociti T regolatori Popolazione di linfociti T che inibiscono l'attivazione o le funzioni effettrici di altri linfociti T e la cui funzione può essere necessaria per mantenere la tolleranza al self. La maggior parte dei linfociti T regolatori sono $CD4^+$ ed esprimono la catena α del recettore IL-2 (CD25), CTLA4 e il fattore di trascrizione FoxP3.

Linfociti T soppressori Linfociti T che bloccano l'attivazione e le funzioni di altri linfociti T effettori. Viste le difficoltà nell'identificare chiaramente i linfociti T soppressori, questo termine non è

molto usato. Una popolazione di cellule T con funzione di controllo della risposta immunitaria meglio caratterizzata è costituita dai linfociti T regolatori.

Linfociti T_H1 Sottopopolazione di linfociti T helper che secerne una serie particolare di citochine, tra cui l'IFN-γ, e la cui principale funzione è stimolare la difesa mediata da fagociti contro le infezioni, soprattutto da parte di microrganismi intracellulari.

Linfociti T_H2 Sottopopolazione di linfociti T helper che secerne una serie particolare di citochine, tra cui l'IL-4, l'IL-5 e l'IL-3, e la cui funzione principale è stimolare le reazioni immunitarie mediate dalle IgE e dagli eosinofili/mastociti.

Linfociti T_H17 Sottopopolazione funzionale di linfociti T $CD4^+$ helper che secernono un caratteristico repertorio di citochine infiammatorie, tra cui l'IL-17 e IL-22 che proteggono nei confronti delle infezioni batteriche e fungine, ma che possono anche mediare processi flogistici associati a patologie infiammatorie e autoimmunitarie.

Linfoma Tumore maligno a carico dei linfociti B o T, che insorge e si espande nell'ambito dei tessuti linfatici. I linfomi spesso esprimono caratteristiche fenotipiche dei linfociti normali da cui originano.

Linfoma di Burkitt Neoplasia maligna dei linfociti B, diagnosticata sulla base delle caratteristiche istologiche, in cui i linfociti presentano quasi sempre una traslocazione cromosomica reciproca che interessa i loci del gene delle immunoglobuline e dell'oncogene cellulare *MYC* situato sul cromosoma 8. Molti casi di linfoma di Burkitt sono associati all'infezione da parte del virus di Epstein-Barr.

Linfonodo Piccolo aggregato nodulare ricco di linfociti rivestito da una capsula fibrosa, posto lungo il decorso dei vasi linfatici di tutto l'organismo; nel linfonodo hanno inizio le risposte immunitarie acquisite nei confronti di antigeni trasportati dalla linfa. I linfonodi hanno un'architettura anatomica specializzata che regola l'interazione dei linfociti B, T, delle cellule dendritiche e degli antigeni per massimizzare l'induzione delle risposte immunitarie protettive.

Linfotossina (LT, TNF-β) Citochina prodotta dai linfociti T, omologa al TNF e che si lega agli stessi recettori. Come il TNF, la LT ha effetti proinfiammatori, determinando l'attivazione dell'endotelio e dei neutrofili. La LT è anche importante per il normale sviluppo degli organi linfoidi.

Lipopolisaccaride (LPS) Sinonimo di endotossina.

Lisosoma Organulo subcellulare a pH acido limitato da membrana, abbondante nelle cellule fagocitiche, che contiene enzimi proteolitici che degradano le proteine derivate principalmente dall'ambiente extracellulare. I lisosomi sono coinvolti nella via di processazione e presentazione dell'antigene delle molecole MHC di classe II.

Lupus eritematoso sistemico (LES) Malattia autoimmune sistemica che colpisce prevalentemente il sesso femminile, caratterizzata da eritema cutaneo, artrite, glomerulonefrite, anemia emolitica, trombocitopenia e coinvolgimento del sistema nervoso centrale. Nei pazienti con LES sono stati riscontrati numerosi autoanticorpi, specialmente anticorpi anti-DNA. Molte alterazioni del LES sono dovute alla formazione di complessi immuni formati dagli autoanticorpi e i relativi antigeni che si depositano nelle arteriole di diversi tessuti. Il meccanismo alla base della perdita della tolleranza al self che si osserva nei pazienti con LES non è ancora noto.

Macrofagi M1 Vedi **Attivazione classica dei macrofagi**.

Macrofagi M2 Vedi **Attivazione alternativa dei macrofagi**.

Macrofago Cellula fagocitica localizzata nei tessuti, derivata dagli organi fetali ematopoietici o dai monociti circolanti, che svolge ruoli importanti nelle risposte immunitarie innate e acquisite. I macrofagi sono attivati da prodotti microbici, come le endotossine, da molecole come CD40L e da citochine prodotte dai linfociti T, come l'IFN-γ. I macrofagi attivati fagocitano e uccidono i microrganismi, secernono citochine proinfiammatorie e presentano gli antigeni ai linfociti T helper. Nei diversi tessuti, i macrofagi possono assumere forme morfologiche differenti, quali la microglia nel sistema nervoso centrale, le cellule di Kupffer nel fegato, i macrofagi alveolari nel polmone e gli osteoclasti nell'osso.

Malattia autoimmune Malattia causata dalla rottura della tolleranza verso il self, con conseguente risposta del sistema immunitario specifico verso gli antigeni autologhi e conseguente danno cellulare e tissutale. Le malattie autoimmuni possono essere provocate da un attacco immunitario contro un organo o tessuto (per esempio la sclerosi multipla, la tiroidite o il diabete di tipo 1) o contro antigeni multipli e presenti a livello sistemico (per esempio il lupus eritematoso sistemico).

Malattia da immunocomplessi Malattia infiammatoria causata dalla deposizione di complessi antigene-anticorpo sulle pareti dei vasi sanguigni, che porta all'attivazione locale del complemento e al reclutamento dei fagociti. I complessi immuni possono formarsi a causa della sovrapproduzione di anticorpi verso antigeni microbici o a causa di autoanticorpi prodotti nel quadro di una malattia autoimmune, come il lupus eritematoso sistemico. La deposizione di complessi immuni a livello delle arteriole, dei glomeruli renali, delle sinovie articolari può causare vasculite con trombosi e danno ischemico in diversi organi.

Malattia da reazione del trapianto verso l'ospite (*Graft-Versus-Host Disease*, GVHD) Malattia che si verifica nei riceventi di trapianto di midollo osseo, causata dalla reazione dei linfociti T

maturi del midollo trapiantato contro gli alloantigeni presenti sulle cellule del ricevente. Il più delle volte la malattia colpisce cute, fegato e intestino.

Malattia da siero Malattia causata dall'iniezione di elevate dosi di un antigene proteico nel sangue, caratterizzata dalla deposizione di complessi antigene-anticorpo sulle pareti dei vasi sanguigni, soprattutto a livello dei reni e delle articolazioni. La deposizione di complessi immuni porta all'attivazione del complemento e al reclutamento dei leucociti, causando glomerulonefrite e artrite. La malattia da siero è stata originariamente descritta come una malattia che compariva in pazienti che ricevevano iniezioni di siero equino contenente anticorpi antitossina per prevenire la difterite; questi pazienti producevano anticorpi contro le proteine del cavallo e complessi immuni composti da tali anticorpi e dagli antigeni iniettati.

Malattia granulomatosa cronica (*Chronic Granulomatous Disease*, CGD) Rara immunodeficienza ereditaria dovuta a mutazioni nei geni che codificano per i componenti del complesso enzimatico dell'ossidasi fagocitica, necessario per l'uccisione dei microrganismi da parte dei leucociti polimorfonucleati e macrofagi. È caratterizzata da ricorrenti infezioni intracellulari batteriche e fungine, spesso accompagnate da risposte immunitarie cellulo-mediate croniche e formazione di granulomi.

Malattia infiammatoria immunomediata Insieme di patologie in larga parte caratterizzate dalla risposta immunitaria verso antigeni autologhi o eterologhi e da infiammazione cronica.

Malattia infiammatoria intestinale (*Inflammatory Bowel Disease*, IBD) Gruppo di patologie, incluse la colite ulcerosa e il morbo di Crohn, caratterizzate da infiammazione cronica del tratto gastrointestinale. L'eziologia dell'IBD non è conosciuta, ma alcune evidenze indicano che è causata da un'inadeguata regolazione della risposta delle cellule T, probabilmente verso batteri commensali dell'intestino. L'IBD si sviluppa in topi knockout per l'IL-2, l'IL-10 o per la catena α del TCR.

Malattie da ipersensibilità Malattie causate da risposte immunitarie. Comprendono le malattie autoimmuni, in cui le risposte immunitarie sono dirette contro antigeni self, e malattie che derivano da risposte incontrollate o eccessive ad antigeni estranei, come i microrganismi e gli allergeni. Il danno tissutale che si verifica nelle malattie da ipersensibilità è dovuto agli stessi meccanismi effettori utilizzati dal sistema immunitario per la protezione contro i microrganismi.

Manicotto linfoide periarteriolare Manicotto di linfociti che circonda le piccole arteriole spleniche, costituito principalmente da linfociti T, i due terzi dei quali circa sono a fenotipo $CD4^+$ e un terzo a fenotipo $CD8^+$.

Mastocita Principale cellula effettrice delle reazioni di ipersensibilità immediata (allergiche). I mastociti derivano da precursori del midollo osseo, risiedono nei tessuti adiacenti ai vasi sanguigni, esprimono un recettore per Fc ad alta affinità per le IgE e contengono numerosi granuli ricchi in mediatori chimici. Il legame di un antigene polivalente (allergene) alle IgE, a loro volta legate ai recettori per Fc del mastocita, determina l'aggregazione dei recettori per Fc, causa la liberazione del contenuto dei granuli nonché la sintesi e la secrezione di nuovi mediatori, dando origine a una reazione di ipersensibilità immediata.

Maturazione dell'affinità Processo che porta a un aumento dell'affinità degli anticorpi per un antigene proteico durante il progredire di una risposta anticorpale T-dipendente. La maturazione dell'affinità è il risultato di mutazioni somatiche a carico dei geni delle IgG cui fa seguito la sopravvivenza selettiva dei linfociti B che producono gli anticorpi a più elevata affinità.

Maturazione linfocitaria Processo tramite il quale le cellule staminali del midollo osseo si differenziano in linfociti B o T naïve esprimenti il recettore per l'antigene e che vanno a popolare i tessuti linfoidi secondari. Questo processo ha luogo in organi specializzati, ovvero nel midollo osseo (per i linfociti B) o nel timo (per i linfociti T). Sinonimo di sviluppo linfocitario.

Memoria Capacità del sistema immunitario specifico di instaurare risposte più rapide, più ampie ed efficaci a ogni nuova esposizione allo stesso antigene.

Micobatteri Genere di batteri, molte specie del quale possono sopravvivere all'interno dei fagociti e indurre malattia. Il principale meccanismo di difesa contro i micobatteri, come per esempio *Mycobacterium tuberculosis*, è rappresentato dall'immunità cellulo-mediata.

Midollo osseo Il tessuto presente all'interno della cavità centrale dell'osso, sede della generazione di tutte le cellule ematiche circolanti nell'adulto, compresi i linfociti immaturi, nonché della maturazione dei linfociti B.

Mieloma multiplo Tumore maligno dei linfociti B producenti anticorpi, spesso secernente Ig o parti di molecole Ig. Gli anticorpi monoclonali prodotti dai mielomi multipli sono stati essenziali per i primi studi biochimici sulla struttura degli anticorpi.

Migrazione linfocitaria Migrazione direzionale di sottopopolazioni di linfociti in particolari tessuti. La migrazione linfocitaria è caratterizzata dall'espressione selettiva di molecole di adesione sull'endotelio e di chemochine a livello tissutale. Per esempio, la migrazione preferenziale di alcuni linfociti verso la mucosa intestinale è regolata dalla chemochina CCL25 e dalla molecola di adesione endoteliale MadCAM, entrambe espresse nell'intestino, che si legano rispettivamente al recettore per le chemochine CCR9 e all'integrina $\alpha_4\beta_7$ espressi dai linfociti.

MIIC (compartimento MHC di classe II) Classe di endosomi (vescicole associate alla membrana coinvolte nelle vie di traffico intracellulare) che si osserva nei macrofagi e nei linfociti B e che svolge un ruolo importante nell'ambito della via di presentazione dell'antigene associata alle molecole MHC di classe II. La classe MIIC contiene tutti i componenti necessari per la formazione dei complessi peptide-MHC di classe II, compresi gli enzimi che degradano gli antigeni proteici, le molecole di classe II, la catena invariante e l'HLA-DM.

Milza Organo linfoide periferico situato nel quadrante superiore sinistro dell'addome. La milza è il sito più importante per le risposte immunitarie specifiche ad antigeni presenti nel torrente circolatorio. La polpa rossa della milza è formata da sinusoidi vascolari ripieni di sangue rivestiti da fagociti che ingeriscono i microrganismi opsonizzati e i globuli rossi danneggiati; la polpa bianca della milza contiene linfociti e follicoli linfatici.

Mimetismo molecolare Presunto meccanismo di autoimmunità scatenato dall'infezione da parte di un microrganismo che esprime antigeni che cross-reagiscono con antigeni autologhi, cosicché la risposta immunitaria verso il microrganismo darà luogo a una reazione contro i tessuti self.

Modello della selezione dei determinanti Modello utilizzato per spiegare la relazione tra risposte immunitarie e molecole MHC, proposto prima che fosse dimostrato il legame peptide-MHC. Il modello postula che i prodotti dei geni MHC di un individuo, come epitopi di una proteina antigenica, siano immunogeni per l'individuo stesso.

Molecola accessoria Molecola della superficie cellulare del linfocita, distinta dal recettore per l'antigene, che media funzioni di trasduzione del segnale o di adesione importanti per l'attivazione o la migrazione linfocitaria.

Molecola del complesso maggiore di istocompatibilità Proteina di membrana eterodimerica codificata nel locus MHC che funge da molecola di presentazione di peptidi per il riconoscimento da parte dei linfociti T. Esistono due tipi strutturalmente distinti di molecole MHC. Le molecole di classe I sono presenti sulla maggior parte delle cellule nucleate, legano peptidi derivati da proteine del citoplasma e sono riconosciute dai linfociti T $CD8^+$. L'espressione di molecole MHC di classe II è in gran parte ristretta a cellule dendritiche, macrofagi e linfociti B, legano peptidi derivati da proteine endocitate e sono riconosciute dai linfociti T $CD4^+$.

Molecola di adesione Molecola della superficie cellulare la cui funzione è promuovere l'interazione con altre cellule o con la matrice extracellulare. I leucociti esprimono vari tipi di molecole di adesione, tra cui le selectine e le integrine, che svolgono un ruolo importante nella migrazione e nell'attivazione cellulare nelle risposte immunitarie innate e specifiche.

Molecola H-2 Molecola MHC del topo. L'MHC murino era originariamente chiamato locus H-2.

Molecole CD Molecole della superficie cellulare espresse da vari tipi cellulari nel sistema immunitario; definite da un numero corrispondente al "gruppo di differenziazione" (nomenclatura CD). Vedi l'Appendice III per un elenco delle molecole CD.

Molecole MHC di classe I Una delle due forme di proteine di membrana eterodimeriche altamente polimorfe che legano e presentano frammenti peptidici di antigeni proteici sulla superficie delle APC per il riconoscimento da parte dei linfociti T. Le molecole MHC di classe I espongono i peptidi derivati da proteine intracellulari, per il riconoscimento da parte dei linfociti T $CD8^+$.

Molecole MHC di classe II Una delle due forme di proteine di membrana eterodimeriche altamente polimorfe che legano e presentano frammenti peptidici di antigeni proteici sulla superficie delle APC per il riconoscimento da parte dei linfociti T. Le molecole MHC di classe II espongono i peptidi derivati da proteine extracellulari internalizzate in vescicole fagocitiche/endocitiche, per il riconoscimento da parte dei linfociti T $CD4^+$.

Monocita Tipo cellulare circolante derivato dal midollo osseo e precursore dei macrofagi tissutali. I monociti sono attivamente reclutati nelle sedi di infiammazione, dove si differenziano in macrofagi.

Morte cellulare indotta da attivazione (*Activation-Induced Cell Death*, AICD) Apoptosi dei linfociti attivati, in genere riferita alle cellule T.

Morte cellulare programmata Vedi **Apoptosi.**

Multivalenza Vedi **Polivalenza**.

Neutrofilo (anche leucocita polimorfonucleato, PMN) Cellula fagocitica caratterizzata da un nucleo segmentato e da granuli citoplasmatici contenenti enzimi litici. I PMN sono la popolazione leucocitaria circolante più rappresentata e costituiscono la principale popolazione cellulare coinvolta nelle fasi iniziali delle risposte infiammatorie alle infezioni batteriche.

***N*-formilmetionina** Aminoacido situato all'inizio della sequenza di tutte le proteine batteriche, ma assente in quelle di mammifero (con l'eccezione di quelle sintetizzate nei mitocondri), che viene riconosciuto dalle cellule dell'immunità innata come un segnale di infezione. I neutrofili esprimono recettori specifici per i peptidi che contengono *N*-formilmetionina il cui ingaggio ne provoca l'attivazione.

Notch 1 Recettore di membrana che viene proteoliticamente tagliato in seguito al riconoscimento del ligando; la porzione intracellulare tagliata trasloca nel nucleo e regola l'espressione genica. I segnali di Notch 1 sono richiesti per la differenziazione dei precursori delle cellule T verso la linea cellulare T αβ.

Nucleotidi CpG Sequenze non metilate di citidina-guanina presenti nel DNA batterico che simulano le risposte immunitarie innate. I nucleotidi CpG sono riconosciuti dal recettore di tipo Toll 9 (TLR9) e hanno proprietà adiuvanti per il sistema immunitario dei mammiferi.

Nucleotidi N Nome dato ai nucleotidi aggiunti in modo casuale alle giunzioni tra i segmenti genici V, D e J durante il riarrangiamento dei geni delle Ig e del TCR nel corso della maturazione dei linfociti. L'aggiunta di fino a 20 di questi nucleotidi, mediata dall'enzima desossiribonucleotidil transferasi terminale (TdT), contribuisce alla diversificazione del repertorio delle Ig e del TCR.

Nucleotidi P Brevi sequenze nucleotidiche invertite, ripetute nelle giunzioni V(D)J dei geni delle Ig e dei TCR riarrangiati, che vengono generate dal taglio asimmetrico del DNA mediato da RAG-

1-e RAG-2, durante le fasi della ricombinazione somatica. I nucleotidi P contribuiscono alla diversità giunzionale del repertorio dei recettori per l'antigene.

Omeostasi Nel sistema immunitario specifico, rappresenta il mantenimento di un numero costante e di un repertorio differenziato di linfociti, nonostante l'emergere di nuovi cloni linfocitari e l'eccezionale espansione di singoli cloni che si verifica durante la risposta ad antigeni microbici. L'omeostasi è realizzata attraverso vie che regolano la morte e l'inattivazione dei linfociti.

Opsonina molecola che si fissa alla superficie di un microrganismo, riconosciuta dai recettori di membrana dei neutrofili e dei macrofagi e che aumenta l'efficacia della fagocitosi del microbo. Le opsonine comprendono anticorpi IgG, che sono riconosciuti dai recettori Fcγ sui fagociti, e frammenti di proteine del complemento, che sono riconosciuti dal recettore per il complemento di tipo 1 (CR1, CD35) e dall'integrina leucocitaria Mac-1.

Opsonizzazione Processo di fissazione delle opsonine, come le IgG o i frammenti del complemento, alle superfici microbiche per favorirne la fagocitosi.

Organi linfoidi primari (o generativi) Organi in cui si sviluppano i linfociti a partire da precursori immaturi. Il midollo osseo e il timo sono i principali organi linfoidi generativi in cui maturano rispettivamente i linfociti B e i linfociti T.

Organi linfoidi secondari (o periferici) Agglomerati organizzati di linfociti e cellule accessorie, come la milza, i linfonodi e i tessuti linfoidi associati alle mucose, in cui iniziano le risposte immunitarie acquisite.

Organi linfoidi terziari Aggregati di linfociti e cellule che presentano l'antigene, organizzati in follicoli B e zone T, che si sviluppano nei siti di infiammazione cronica immunomediata, come la sinovia dei pazienti con artrite reumatoide.

Orticaria Tumefazione e arrossamento transitorio della cute provocato dalla fuoriuscita di liquido e proteine plasmatiche dai vasi del microcircolo del derma nel corso di una reazione di ipersensibilità immediata.

Ossido nitrico (monossido di azoto) Molecola effettrice ad ampio spettro di attività biologiche che, nei macrofagi, agisce come potente agente microbicida nei confronti dei microrganismi fagocitati.

Patogenicità Capacità di un microrganismo di causare malattia. Numerosi meccanismi possono contribuire alla patogenicità, come la produzione di tossine, la stimolazione di risposte infiammatorie nell'ospite e la perturbazione del metabolismo delle cellule dell'ospite.

Pattern molecolari associati al danno (*Damage-Associated Molecular Patterns*, DAMP) Molecole endogene prodotte o rilasciate da cellule danneggiate o morenti e che si legano a PRR (*Pattern Recognition Receptor*) e stimolano l'immunità innata. Esempi includono HMGB1 (*High-Mobility Group Box 1*), ATP extracellulare e acido urico.

PD-1 Recettore inibitorio omologo a CD28 che è espresso sui linfociti T attivati e si lega a PD-L1 o PD-L2, membri della famiglia di proteine B7 espressi su vari tipi cellulari. PD-1 viene up-regolato sui linfociti T nelle infezioni croniche o nei tumori e il blocco di PD-1 con anticorpi monoclonali migliora le risposte immunitarie anti-tumorali.

Pentrassine Famiglia di proteine plasmatiche, ciascuna formata da cinque subunità globulari identiche, tra cui la proteina di fase acuta chiamata proteina C reattiva.

Peptide antagonista Ligando peptidico mutato di un particolare TCR in cui sono stati cambiati uno o più degli aminoacidi di contatto con il TCR e in grado di inviare segnali negativi che inibiscono la risposta dei linfociti T ai peptidi nativi.

Peptide della catena invariante associato alle molecole MHC di classe II (*CLass II – associated Invariant chain Peptide*, CLIP) Peptide residuo della catena invariante che si localizza nella tasca di legame per i peptidi delle molecole MHC di classe II; è rimosso dall'azione della

molecola HLA-DM in modo che la tasca possa essere accessibile ai peptidi originati dagli antigeni proteici extracellulari sottoposti a endocitosi.

Perforina Proteina che forma pori, omologa alla proteina del complemento C9, presente come monomero nei granuli dei CTL e delle cellule NK. Quando la perforina è rilasciata dai granuli dei CTL o delle cellule NK attivate, promuove l'ingresso del granzima nella cellula bersaglio inducendone la morte per apoptosi.

Placche di Peyer Tessuto linfoide organizzato nella lamina propria dell'intestino tenue, in cui possono avere inizio le risposte immunitarie verso i patogeni intestinali e altri antigeni ingeriti. Le placche di Peyer sono composte principalmente da linfociti B, con minori quantità di linfociti T e APC, organizzati in follicoli spesso dotati di centro germinativo simili a quelli presenti nei linfonodi.

Plasmablasto Cellula secernente anticorpi circolante, che può essere il precursore delle plasmacellule che risiedono nel midollo osseo o in altri tessuti.

Plasmacellula Linfocita B a differenziazione terminale, secernente anticorpi, con un caratteristico aspetto istologico che comprende forma ovale, nucleo eccentrico e un alone perinucleare.

Polimorfismo Esistenza di due o più forme alternative (varianti) di un determinato gene, presenti con frequenze stabili in una popolazione. Ogni variante comune di un gene polimorfo è detta allele; un individuo può essere portatore di due differenti alleli di uno stesso gene, ciascuno ereditato da uno dei due genitori. Nei mammiferi, i geni MHC sono quelli dotati di maggiore polimorfismo, alcuni di questi geni hanno infatti migliaia di alleli.

Polivalenza Presenza di numerose copie dello stesso epitopo su una singola molecola di antigene o sulla superficie di una cellula o particella. Questi antigeni polivalenti, come i residui polisaccaridici presenti sulla capsula di alcuni batteri, sono in grado di attivare i linfociti B in modo indipendente dalle cellule T helper. Il termine è usato anche come sinonimo di multivalenza.

Polpa bianca Parte del tessuto splenico composta prevalentemente da linfociti, organizzati in manicotti linfoidi periarteriolari e follicoli. Il resto della milza (polpa rossa) contiene sinusoidi vascolari tappezzati da fagociti e ripieni di sangue.

Polpa rossa Compartimento anatomofunzionale della milza formato da sinusoidi vascolari, tra cui è distribuito un numero elevato di macrofagi, cellule dendritiche, linfociti e plasmacellule. I macrofagi della polpa rossa eliminano dal sangue i microrganismi, altre particelle estranee e gli eritrociti danneggiati.

Presentazione dell'antigene Esposizione di peptidi in associazione a molecole dell'MHC sulla superficie di un'APC, che consente il riconoscimento specifico da parte del TCR e l'attivazione del linfocita T.

Presentazione diretta dell'antigene (o alloriconoscimento diretto) Presentazione di molecole MHC allogeniche da parte delle APC di un organo trapiantato che portano all'attivazione dei linfociti T alloreattivi. Nel riconoscimento diretto di molecole MHC allogeniche, un TCR, selezionato per riconoscere il complesso di molecole MHC autologhe con un peptide eterologo, cross-reagisce con la molecola MHC eterologa legata a un peptide. La presentazione diretta è in parte responsabile della potente risposta delle cellule T ai trapianti allogenici.

Presentazione indiretta dell'antigene Nell'immunologia dei trapianti, via di presentazione delle molecole MHC allogeniche del donatore da parte delle APC del ricevente, mediante gli stessi meccanismi di presentazione delle proteine microbiche. Le proteine MHC allogeniche sono processate dalle APC professionali del ricevente e i peptidi da esse derivati sono presentati, in associazione con le molecole MHC del ricevente (self), ai linfociti T dell'ospite. Questo meccanismo differisce dalla presentazione diretta dell'antigene che comporta invece il

riconoscimento da parte dei linfociti T del ricevente di molecole MHC allogeniche non processate sulla superficie delle cellule trapiantate.

Pre-Tα Proteina transmembrana non polimorfa, con un singolo dominio Ig extracellulare che si associa alla catena b del TCR per formare il prerecettore delle cellule T della cellula pre-T.

Privilegio immunologico Caratteristica di alcuni distretti dell'organismo che sono inaccessibili alle risposte immunitarie o in grado di sopprimerle costitutivamente come, per esempio la camera anteriore dell'occhio, i testicoli e il cervello.

Processazione dell'antigene Conversione a livello intracellulare di proteine antigeniche derivate dallo spazio extracellulare o dal citosol nei peptidi e il caricamento di tali peptidi sulle molecole MHC per la presentazione ai linfociti T.

Profili molecolari associati ai patogeni (*Pathogen-Associated Molecular Patterns,* PAMP) Strutture molecolari presenti su microrganismi ma non nelle cellule di mammifero (ospite) che sono riconosciute e stimolano l'immunità innata. Tra esse vi sono, per esempio il lipopolisaccaride batterico e l'RNA a doppia elica virale.

Promotore Sequenza di DNA localizzata in posizione 5′ rispetto al sito d'inizio della trascrizione di un gene; a questa regione si legano i fattori che danno inizio alla trascrizione. Il termine promotore è spesso usato per indicare l'intera regione regolatrice situata in posizione 5′ di un gene, comprese le sequenze degli enhancer, che rappresentano sequenze in grado di legare i fattori di trascrizione e di interagire con l'intero complesso di trascrizione, potenziandone l'attività. Altre sequenze enhancer possono essere localizzate relativamente distanti dal promotore, in posizione 5′ rispetto al gene, negli introni, o in posizione 3′.

Prostaglandine Classe di mediatori lipidici dell'infiammazione prodotti da molti tipi cellulari e derivati dall'acido arachidonico attraverso la via della ciclossigenasi, con proprietà di vasodilatazione, broncocostrizione e attività chemotattica. Le prostaglandine prodotte dai mastociti sono i più importanti mediatori delle reazioni allergiche.

Proteasi Enzima che scinde i legami peptidici e che perciò frammenta le proteine in peptidi. Le diverse proteasi hanno un diverso spettro di specificità per i legami tra i residui aminoacidici. Le proteasi presenti all'interno dei fagociti sono importanti per l'uccisione dei microbi ingeriti durante l'immunità innata; tuttavia, le proteasi rilasciate dai fagociti nei focolai infiammatori sono responsabili del danno tissutale. Le proteasi espresse dalle APC sono essenziali per generare i frammenti peptidici di antigeni proteici che si legano alle molecole MHC durante la risposta immunitaria cellulo-mediata.

Proteasoma Grande complesso enzimatico multiproteico con ampio spettro di attività proteolitiche e presente nel citoplasma della maggior parte delle cellule; genera, a partire dalle proteine citosoliche, i peptidi che legano le molecole MHC di classe I. Le proteine vengono indirizzate alla degradazione da parte del proteasoma grazie al legame covalente con molecole di ubiquitina.

Proteina adattatrice Proteina coinvolta nelle vie di trasduzione del segnale nei linfociti. Tali proteine fungono da molecole ponte o costituiscono strutture che permettono il reclutamento di altre molecole coinvolte nelle trasduzione del segnale. Durante la trasduzione del segnale le molecole adattatrici possono essere fosforilate a livello dei residui di tirosina consentendo il legame di altre proteine dotate di domini SH2. Le molecole adattatrici coinvolte nell'attivazione dei linfociti T comprendono le proteine LAT, SLP-76 e Grb-2.

Proteina C reattiva (*C-Reactive Protein,* CRP) Proteina plasmatica della famiglia delle pentraxine coinvolta nelle risposte dell'immunità innata verso le infezioni batteriche. È una proteina di fase acuta che si lega alla capsula degli pneumococchi, oltre che al frammento C1q, e può quindi attivare il complemento o agire da opsonina legando i recettori del C1q espressi dalle cellule fagocitiche.

Proteina chinasi C (*Protein Kinase C*, PKC) Una delle isoforme di un enzima che catalizza la fosforilazione di residui di serina e treonina in numerosi substrati proteici, propagando diverse vie di trasduzione del segnale che portano all'attivazione di fattori trascrizionali. Nei linfociti T e B, la PKC è attivata dal diacilglicerolo generato in risposta all'aggregazione dei recettori per l'antigene.

Proteina di attivazione 1 (*Activation Protein 1*, AP-1) Famiglia di fattori trascrizionali che legano il DNA, composta da dimeri uniti tramite un comune motivo strutturale definito cerniera di leucina. Il fattore AP-1 meglio caratterizzato è formato dalle proteine Fos e Jun. AP-1 è coinvolto nella regolazione della trascrizione di molti geni che svolgono un ruolo importante nel sistema immunitario, come i geni delle citochine.

Proteina tirosina chinasi (*Protein Tyrosine Kinases*, PTK) Enzimi che fosforilano i residui di tirosina nelle proteine e quindi promuovono l'interazione con proteine che riconoscono le fosfotirosine. Le PTK sono coinvolte in numerose vie di trasduzione del segnale nelle cellule del sistema immunitario.

Proteine di fase acuta Proteine, generalmente di origine epatica, prodotte in risposta a citochine infiammatorie come IL-6 e IL-1 la cui concentrazione plasmatica aumenta in seguito a un processo infettivo nell'ambito della cosiddetta sindrome da risposta infiammatoria sistemica. Fanno parte di queste proteine la proteina C reattiva, il fibrinogeno e la proteina amiloide A sierica. Le proteine di fase acuta sono importanti nell'ambito della risposta immunitaria innata verso i microbi.

Proteine G Proteine che legano i nucleotidi guaninici che catalizzano la reazione di sostituzione del GDP legato con il GTP. Le proteine G legate al GTP possono attivare vari enzimi cellulari in differenti cascate di trasduzione del segnale. Le proteine G trimeriche sono associate con la porzione citoplasmatica di numerosi recettori cellulari, come i recettori per le chemochine. Altre proteine G solubili di piccole dimensioni, come Ras e Raf, sono reclutate nelle vie di trasduzione del segnale da proteine adattatrici.

Protozoi Organismi eucarioti monocellulari, molti dei quali parassiti dell'uomo e causa di malattie. Esempi di protozoi patogeni sono *Entamoeba histolytica*, che provoca la dissenteria amebica; *Plasmodium*, che causa la malaria; e *Leishmania*, che causa la leishmaniosi. I protozoi stimolano risposte immunitarie sia innate sia acquisite.

Provirus Copia del DNA del genoma di un retrovirus integrata nel genoma della cellula ospite e a partire dalla quale sono trascritti i geni virali ed è duplicato il genoma virale. I provirus dell'HIV possono rimanere inattivi per lunghi periodi di tempo e rappresentano pertanto una forma latente di infezione da HIV che non è accessibile alle difese immunitarie.

RAG-1* e *RAG-2 Geni che codificano per le proteine RAG-1 e RAG-2, componenti linfocito-specifiche della ricombinasi V(D)J critiche per gli eventi di ricombinazione del DNA, che danno origine ai geni funzionali per le Ig e il TCR. Le proteine RAG sono espresse dai linfociti B e T nel corso della loro maturazione e si legano alle sequenze di riconoscimento della ricombinazione, formate da un tratto altamente conservato di sette nucleotidi (eptamero), adiacente a ciascuna delle sequenze codificanti V, D e J, seguito da uno spaziatore di esattamente 12 o 23 nucleotidi non conservati, seguito a sua volta da un tratto altamente conservato di 9 nucleotidi (nonamero). Pertanto le proteine RAG sono necessarie per l'espressione dei recettori per l'antigene e per la maturazione dei linfociti B e T.

Rapamicina Farmaco immunosoppressorio (chiamato anche Sirolimus) usato in clinica per prevenire il rigetto dell'allotrapianto. La rapamicina inibisce l'attivazione di una proteina chiamata bersaglio molecolare della rapamicina (*mammalian Target Of Rapamicyn*, mTOR) che è al centro di numerose vie metaboliche e di crescita cellulare, come la via di trasduzione dell'IL-2 per la proliferazione dei linfociti T.

Ras Appartiene a una famiglia di proteine di 21 kD che legano la guanina, provviste di un'attività GTPasica intrinseca e coinvolta in molteplici vie di trasduzione del segnale in diversi tipi cellulari. Mutazioni a carico dei geni Ras sono associate alla trasformazione neoplastica. Nell'attivazione dei linfociti T, Ras viene reclutato alla membrana plasmatica da proteine adattatrici fosforilate in tirosina, dove viene attivato da fattori di scambio GDP-GTP. GTP·Ras avvia la cascata delle MAP chinasi, che porta all'espressione del gene *fos* e all'assemblaggio del fattore di trascrizione AP-1.

Reagina IgE che media una reazione di ipersensibilità immediata.

Reazione a catena della polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) Tecnica che permette di copiare e amplificare rapidamente sequenze specifiche di DNA della lunghezza di circa 1 kb. Ampiamente usata in tutte le branche della biologia molecolare per la preparazione e l'analisi di frammenti di DNA. Il metodo si basa sull'utilizzo di brevi sequenze oligonucleotidiche, dette primer, complementari alle sequenze localizzate alle estremità del frammento di DNA da amplificare, che vengono utilizzate in cicli ripetitivi di apertura della doppia elica del DNA, associazione e sintesi di un nuovo frammento di DNA.

Reazione di Arthus Forma localizzata di vasculite sperimentale mediata da complessi immuni, indotta iniettando in sede sottocutanea un antigene in un animale precedentemente immunizzato o in un animale cui è stato somministrato per via endovenosa un anticorpo specifico per quel dato antigene. Gli anticorpi circolanti si legano all'antigene iniettato, formando complessi immuni che si depositano sulle pareti delle piccole arterie nella sede di iniezione, dando origine a una vasculite cutanea locale con necrosi.

Reazione di fase tardiva Fase della reazione di ipersensibilità immediata che segue di diverse ore la degranulazione dei mastociti e dei basofili ed è caratterizzata da un infiltrato infiammatorio di eosinofili, basofili, neutrofili e linfociti. Ripetuti episodi di reazione di fase tardiva possono causare un danno tissutale.

Reazione di Shwartzman Modello sperimentale nel coniglio degli effetti patologici dell'LPS batterico e del TNF in cui due iniezioni endovenose di LPS sono somministrate a distanza di 24 ore. Dopo la seconda iniezione, il coniglio presenta una trombosi intravascolare disseminata e aggregazione di neutrofili e piastrine nei vasi sanguigni di piccolo calibro.

Reazione leucocitaria mista (*Mixed Leukocyte Reaction*, MLR) Risposta *in vitro* dei linfociti T alloreattivi di un individuo verso le molecole MHC espresse sui leucociti di un altro soggetto. La MLR comporta la proliferazione e la secrezione di citochine da parte sia dei linfociti T $CD4^{++}$ sia di quelli $CD8^{+}$; è utilizzata come test di screening per determinare la compatibilità tra un potenziale ricevente di trapianto e un potenziale donatore.

Reazione pomfoide Tumefazione e arrossamento cutaneo locale nella sede di una reazione di ipersensibilità immediata. Il pomfo evidenzia l'aumento della permeabilità vascolare e l'arrossamento è causato dall'aumento del flusso ematico locale; entrambe le alterazioni derivano dal rilascio di mediatori chimici, come l'istamina, da parte dei mastociti attivati del derma.

Reazioni da trasfusione Reazioni immunologiche contro prodotti ematici trasfusi, in genere mediata da anticorpi preformati nel ricevente, che legano gli antigeni delle cellule ematiche del donatore, quali gli antigeni dei gruppi AB0 o gli antigeni di istocompatibilità. Le reazioni trasfusionali possono portare alla lisi intravascolare dei globuli rossi e, nei casi gravi, a danno renale, febbre, shock e coagulazione intravascolare disseminata.

Recettore γt orfano legato ai retinoidi (*Retinoid-Related Orphan Receptor* γ*t*, RORγt) Fattore di trascrizione espresso e necessario per la differenziazione delle cellule T_H17 e delle cellule linfoidi innate di tipo 3.

Recettore delle cellule B (*B Cells Receptor*, BCR) Recettore di membrana per l'antigene dei linfociti B, ovvero una immunoglobulina legata alla membrana.

Recettore delle cellule T (*T Cell Receptor*, TCR) Recettore per l'antigene dei linfociti T, distribuito clonalmente sui linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$, che riconosce complessi formati da peptidi estranei legati a molecole MHC autologhe sulla superficie delle APC. La forma più comune di TCR è composta da un eterodimero formato da due catene polipeptidiche transmembrana legate mediante ponti disolfuro, denominate a e b, ciascuna costituita da un dominio *N*-terminale variabile (V) Ig-simile, un dominio costante (C) Ig-simile, una regione idrofobica transmembrana e una breve regione citoplasmatica. Un tipo meno frequente di TCR, composto dalle catene γ e δ, è espresso da una piccola sottopopolazione di linfociti T che riconosce forme diverse di antigene.

Recettore Fc (FcR) Recettore della superficie cellulare specifico per la regione costante carbossiterminale di una molecola di Ig. I recettori Fc (o "per l'Fc") sono solitamente complessi multiproteici formati da subunità leganti le Ig e subunità effettrici in grado di trasdurre segnali intracellulari. Vi sono diversi tipi di recettori Fc, compresi quelli specifici per differenti isotipi di Ig, le IgE e le IgA. I recettori Fc mediano molte delle funzioni effettrici degli anticorpi, tra cui la fagocitosi di microrganismi complessati da anticorpi (opsonizzati), l'attivazione dei mastociti e l'attivazione delle cellule NK.

Recettore Fc neonatale (*Neonatal Fc Receptor*, FcRn) Recettore Fc che media in modo specifico il trasporto delle IgG materne attraverso la placenta e l'epitelio intestinale del neonato, mentre negli adulti promuove la lunga emivita delle molecole IgG nel sangue proteggendole dal catabolismo dei fagociti o delle cellule endoteliali.

Recettore Fcγ (FcγR) Recettore di membrana specifico per la regione costante carbossiterminale delle IgG. Esistono vari tipi di recettori Fcγ, tra cui il recettore ad alta affinità FcγRI, che media la fagocitosi da parte di macrofagi e neutrofili; il recettore FcγRIIb, che trasduce i segnali inibitori nei linfociti B; e il recettore a bassa affinità FcγRIIIB, che media il direzionamento e l'attivazione delle cellule NK verso i loro bersagli cellulari.

Recettore FcεRI Recettore ad alta affinità per la regione costante carbossiterminale delle IgE; è espresso sulla membrana dei mastociti, dei basofili e degli eosinofili. Le molecole FcεRI presenti sui mastociti sono in genere occupate dalle IgE e l'aggregazione dei complessi IgE-FcεRI indotta dall'antigene attiva il mastocita, innescando le reazioni di ipersensibilità immediata.

Recettore per il complemento di tipo 1 (CR1) Recettore ad alta affinità per i frammenti C3b e C4b del complemento. I fagociti utilizzano il CR1 per l'internalizzazione di particelle rivestite di C3b o C4b. Negli eritrociti il CR1 è necessario nella rimozione degli immunocomplessi dal circolo. È anche un regolatore dell'attivazione del complemento.

Recettore per il complemento di tipo 2 (CR2) Recettore espresso sulla membrana dei linfociti B e sulle cellule follicolari dendritiche che lega i frammenti proteolitici della proteina del complemento C3, tra cui C3d, C3dg e iC3b. Il CR2 agisce stimolando le risposte immunitarie umorali potenziando l'attivazione dei linfociti B da parte dell'antigene e favorendo la captazione dei complessi antigene-anticorpo da parte delle cellule follicolari dendritiche dei centri germinativi. Il CR2 è anche il recettore per il virus di Epstein-Barr.

Recettore per il mannosio Lectina espressa dai macrofagi che lega residui di mannosio e fucosio presenti sulle pareti delle cellule microbiche e media la loro fagocitosi.

Recettore poli-Ig Recettore per Fc espresso dalle cellule epiteliali mucose che media il trasporto di IgM e IgA attraverso l'epitelio verso il lume intestinale. È anche chiamato componente secretoria.

Recettore pre-B Recettore espresso sui linfociti B in via di sviluppo allo stadio pre-B, composto da catene pesanti μ e da catene leggere sostitutive invariabili. Il recettore pre-B si associa alle catene di trasduzione del segnale Igα e Igβ per formare il complesso recettoriale pre-B. I recettori pre-B sono necessari per stimolare la proliferazione e l'ulteriore maturazione del linfocita B, permettendo riarrangiamenti produttivi V(D)J della catena pesante μ. Non è noto se il recettore pre-B leghi un ligando specifico.

Recettore pre-T Recettore espresso sulla superficie dei linfociti pre-T, composto dalla catena β del TCR e da una proteina invariabile pre-Tα. Questo recettore si associa con le molecole CD3 e ζ, formando il complesso recettoriale pre-T. Il ruolo svolto da questo complesso nei linfociti pre-T è simile a quello del recettore pre-B nello sviluppo del linfocita B. In particolare, il recettore pre-T attiva segnali di trasduzione che stimolano il riarrangiamento genico del TCR e l'ulteriore proliferazione e maturazione del linfocita. Non è noto se il recettore pre-T leghi uno specifico ligando.

Recettori che riconoscono i profili molecolari (*Pattern Recognition Receptors*, PRR) Recettori del sistema immunitario innato che riconoscono PAMPs e DAMPs e attivano risposte immunitarie innate. Esempi sono i recettori TLR e NLR.

Recettori di homing Recettori di adesione presenti sulla superficie dei linfociti e responsabili delle diverse vie di ricircolo linfocitario e di homing tissutale. I recettori di homing si legano a ligandi (detti addressine) espressi sulle cellule endoteliali in particolari letti vascolari.

Recettori di morte cellulare Recettori di membrana espressi in diversi tipi di cellule che, in seguito al legame con il ligando specifico, trasducono segnali che inducono il reclutamento della proteina adattatrice FADD (*Fas-Associated Death Domain*) e l'attivazione della capsasi-8, causando morte cellulare per apoptosi. Tutti i recettori di morte, incluso FAS, TRAIL-R e il TNF-R, appartengono alla superfamiglia dei recettori del TNF.

Recettori inibitori della citotossicità (*Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors*, KIR) Recettori espressi dalle cellule NK che riconoscono molecole MHC di classe I self e trasducono segnali inibitori che impediscono l'attivazione dei meccanismi citolitici delle cellule NK. Questi recettori assicurano che le cellule NK non uccidano le cellule normali dell'ospite, che esprimono molecole MHC di classe I, mentre permettono la lisi di cellule infettate da virus in cui l'espressione di MHC di classe I è soppressa. Sono state descritte varie classi di recettori inibitori, tra cui membri della superfamiglia delle immunoglobuline, eterodimeri tra CD94 e una lectina, e Ly49. Tutti questi recettori contengono code citoplasmatiche con sequenze ITIM, coinvolte nell'attivazione dei segnali inibitori.

Recettori NOD-like (*NOD-Like Receptors*, NLR) Famiglia di proteine citosoliche multidominio che riconoscono PAMP e DAMP e reclutano altre proteine a formare complessi che promuovono l'infiammazione.

Recettori per il TNF I recettori di membrana per il TNF-α e TNF-β (LT) sono espressi da numerosi tipi cellulari. Esistono due distinti recettori per il TNF, il TNF-RI e il TNF-RII; tuttavia la maggior parte degli effetti biologici del TNF è mediata dal TNF-RI. I recettori per il TNF appartengono a una famiglia di recettori omologhi dotati nella porzione extracellulare di sequenze ricche di cisteina, di cui fanno parte anche Fas e CD40.

Recettori per le chemochine Recettori di membrana per le chemochine che trasducono segnali che stimolano la migrazione dei leucociti. Vi sono almeno 19 differenti recettori di chemochine nei mammiferi, ognuno dei quali si lega a un differente gruppo di chemochine; sono tutti membri della famiglia dei recettori a sette domini transmembrana ad α-elica, legati alle proteine G.

Recettori per le citochine di tipo I Famiglia di recettori per le citochine, chiamata anche dei recettori dell'emopoietina, che contengono motivi strutturali conservati nei loro domini extracellulari e che legano le citochine che si ripiegano in quattro α-eliche, come IL-2, IL-3, IL-

4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-13, IL-15, GM-CSF, G-CSF e l'ormone della crescita. Alcuni di questi recettori sono formati da una catena che lega il ligando e da una o più catene deputate alla trasduzione del segnale; tutte queste catene hanno gli stessi motivi strutturali. I recettori per le citochine di tipo I dimerizzano in seguito al legame con la loro citochina, e inviano segnali all'interno della cellula attraverso la via JAK/STAT.

Recettori scavenger ("spazzino") Famiglia di recettori di membrana espressi sui macrofagi; originariamente identificati come recettori che mediano l'endocitosi di lipoproteine a bassa densità ossidate o acetilate, sono in grado di legare anche diversi microrganismi favorendone la fagocitosi.

Recettori tipo RIG (*RIG-Like Receptors*, RLR) Recettori citosolici del sistema immunitario innato che riconoscono l'RNA virale e inducono la produzione di IFN di tipo I. I due RLR meglio caratterizzati sono il gene I acido-retinoico inducibile (*Retinoid-Inducible Gene 1*, RIG-1) e il gene 5 associato alla differenziazione del melanoma (*Melanoma Differentiation-Associated Gene* 5, MDA5).

Recettori Toll-like (*Toll-Like Receptors*, TLR) Recettori dell'immunità innata, che fanno parte della famiglia di recettori dei PRR; sono espressi sulla membrana plasmatica ed endosomiale di molti tipi cellulari, riconoscono strutture microbiche come l'endotossina e l'RNA virale e innescano una trasduzione del segnale che porta all'espressione di geni infiammatori e antivirali.

Regione cerniera Regione delle catene pesanti delle Ig situata tra i primi due domini costanti; può assumere diverse conformazioni e conferisce flessibilità ai due siti Fab di legame dell'antigene. Grazie alla regione cerniera, un anticorpo può legare simultaneamente due epitopi situati a una distanza compatibile con quella delle due regioni Fab, quale che sia il loro orientamento spaziale.

Regione costante (C) Porzione delle catene polipeptidiche di un'Ig o di un TCR la cui sequenza non varia tra i differenti cloni linfocitari e che non è coinvolta nel legame con l'antigene. Le regioni C sono codificate da sequenze di DNA nei loci genici delle Ig e del TCR spazialmente separate da quelle che codificano per le regioni variabili (V).

Regione determinante la complementariete (*Complementarity-Determining Region*, CDR) Brevi segmenti delle molecole degli anticorpi e del TCR che prendono contatto con l'antigene. Chiamate anche regioni ipervariabili. Tre regioni CDR sono presenti nel dominio variabile di ciascuna delle due catene polipeptidiche del recettore per l'antigene, BCR o TCR. Questi segmenti ipervariabili assumono una conformazione ad ansa a formare una superficie complementare alla struttura tridimensionale dell'antigene legato.

Regione ipervariabile Segmenti di circa 10 aminoacidi presenti all'interno delle regioni variabili delle Ig o del TCR che formano le strutture ad ansa che entrano in contatto con l'antigene. In ogni catena pesante o leggera e in ogni catena del TCR sono presenti tre regioni ipervariabili, definite anche CDR. La maggior parte della variabilità delle Ig o del TCR è localizzata in queste regioni.

Regione variabile (V) Regione extracellulare *N*-terminale di una catena leggera o pesante delle Ig o di una catena α, β, γ o δ del TCR che contiene sequenze aminoacidiche variabili che differiscono tra ogni clone di linfociti e che sono responsabili della specificità antigenica. Le sequenze variabili che interagiscono con l'antigene sono localizzate nei segmenti ipervariabili.

Repertorio Insieme completo dei recettori per l'antigene, e pertanto delle specificità antigeniche, espressi da tutti i linfociti T e B di un individuo.

Repertorio anticorpale Insieme delle diverse specificità anticorpali espresse da un individuo.

Repertorio linfocitario Insieme dei recettori per l'antigene, e pertanto dell'intero spettro delle specificità per gli antigeni, espresso dai linfociti T e B in un individuo.

Residui àncora Residui aminoacidici di un peptide le cui catene laterali alloggiano nelle nicchie presenti nella tasca di una molecola MHC. Le catene laterali si legano ad aminoacidi

complementari presenti nella molecola MHC e hanno la funzione di ancorare il peptide nella tasca.

Restrizione per MHC Caratteristica dei linfociti T di riconoscere un antigene peptidico estraneo solo quando legato a una particolare forma allelica di una molecola MHC.

Restrizione per MHC self Limitazione (o restrizione) delle cellule T nel riconoscimento di antigeni legati a molecole MHC che i linfociti T incontrano durante la maturazione nel timo (e quindi vedono come autologhi).

Ricircolazione linfocitaria Il movimento continuo dei linfociti naïve dal circolo sanguigno agli organi linfoidi secondari e di nuovo al sangue.

Ricombinasi V(D)J Complesso enzimatico costituito dalle proteine RAG1 e RAG2, che catalizza la ricombinazione genica per i recettori per l'antigene dei linfociti.

Ricombinazione per scambio Meccanismo molecolare alla base dello scambio isotipico della catena pesante dell'Ig attraverso cui un linfocita B in un segmento genico riarrangiato V(D)J si ricombina con un gene C a valle con delezione del gene o dei geni C interposti. Gli eventi di ricombinazione del DNA che si verificano nella ricombinazione per scambio, innescati da CD40L e dalle citochine, coinvolgono sequenze nucleotidiche (regioni S) localizzate negli introni in posizione 5′ di ciascun locus C_H.

Ricombinazione somatica Processo di ricombinazione del DNA attraverso il quale si formano i geni che codificano per le regioni variabili dei recettori per l'antigene durante il processo di maturazione linfocitaria. Una serie relativamente limitata di sequenze di DNA, separate l'una dall'altra nel genoma della linea germinativa, vengono avvicinate in seguito a delezione delle sequenze interposte. Questo processo si verifica solo nei linfociti B e T in via di sviluppo, ed è mediata dalle proteine RAG-1 e RAG-2. Questo processo è anche chiamato ricombinazione V(D)J o riarrangiamento somatico.

Rigetto acuto Forma di rigetto di trapianto che comporta un danno vascolare e parenchimale mediato da linfociti T, macrofagi e anticorpi e che avviene da giorni a settimane dopo il trapianto, ma anche successivamente se l'immunosoppressione farmacologica diventa inadeguata.

Rigetto cronico Forma di rigetto che si verifica a considerevole distanza di tempo da un allotrapianto; è caratterizzata da fibrosi dell'organo trapiantato con perdita della sua normale struttura. Frequentemente il rigetto cronico è caratterizzato dall'occlusione arteriolare che si verifica in seguito alla proliferazione delle cellule muscolari lisce della tonaca intima dei vasi dell'organo trapiantato, fenomeno che prende il nome di arteriosclerosi del trapianto.

Rigetto del trapianto Risposta immunitaria specifica verso un trapianto d'organo o tessuto che provoca infiammazione, danno ed eventualmente fallimento del trapianto.

Rigetto iperacuto Forma di rigetto di allotrapianto o xenotrapianto che inizia entro pochi minuti o alcune ore dopo l'intervento ed è caratterizzata dall'occlusione trombotica dei vasi del trapianto. Il rigetto iperacuto è mediato da anticorpi preesistenti nel circolo sanguigno dell'ospite che legano gli antigeni endoteliali del trapianto (come gli antigeni di gruppo sanguigno o molecole MHC).

Rigetto primario Rigetto di un allotrapianto in un individuo che non ha precedentemente ricevuto trapianti o è stato in altro modo esposto agli alloantigeni tissutali dello stesso donatore. Il rigetto primario si verifica generalmente entro i primi 7-10 giorni dal trapianto.

Rigetto ritardato di xenotrapianto Forma di rigetto che si verifica frequentemente entro 2 o 3 giorni dallo xenotrapianto ed è caratterizzata da trombosi intravascolare e necrosi fibrinoide delle pareti dei vasi. Il rigetto ritardato dello xenotrapianto è probabilmente dovuto al danno a livello endoteliale causato da anticorpi e citochine.

Rigetto secondario Rigetto dell'allotrapianto in un individuo che è stato precedentemente sensibilizzato agli alloantigeni tissutali del donatore per aver ricevuto da esso un altro trapianto o una trasfusione. Contrariamente al rigetto primario, che si presenta in un individuo non precedentemente sensibilizzato agli alloantigeni del donatore, il rigetto secondario è rapido e si verifica a 3-7 giorni dal trapianto, come conseguenza della memoria immunologica.

Risposta di fase acuta Aumento della concentrazione plasmatica di numerose proteine, dette proteine di fase acuta, che si verifica come parte della risposta innata alle infezioni.

Risposta immunitaria Risposta collettiva e coordinata all'introduzione nell'organismo di sostanze estranee, mediata dalle cellule e dalle molecole del sistema immunitario.

Risposta immunitaria primaria Risposta immunitaria acquisita che si verifica dopo la prima esposizione di un soggetto a un antigene estraneo. In confronto alle risposte che si verificano dopo una seconda o una successiva esposizione allo stesso antigene, le risposte primarie sono di modesta entità e caratterizzate da una cinetica relativamente lenta.

Risposta immunitaria secondaria Risposta immunitaria specifica che si verifica in seguito alla seconda esposizione all'antigene. Rispetto alla risposta primaria, che si verifica alla prima esposizione, la risposta secondaria è caratterizzata da una cinetica più rapida e da una maggiore intensità.

RORγt (*Retinoid-Related Orphan Receptor γt*) Vedi **Recettore γt orfano legato ai retinoidi**.

Sarcoma di Kaposi Tumore maligno delle cellule vascolari che si presenta frequentemente nei malati di AIDS. Nell'uomo, il sarcoma di Kaposi è associato all'infezione da herpes virus 8.

Scambio di classe della catena pesante (o dell'isotipo) Processo attraverso il quale un linfocita B cambia l'isotipo degli anticorpi prodotti, da IgM a IgG, IgE o IgA, senza tuttavia modificare la specificità dell'anticorpo. Lo scambio isotipico è stimolato da citochine e da CD40L espresso dai linfociti T helper e comporta la ricombinazione del segmento V(D)J riarrangiato della catena pesante con segmenti genici della regione costante a valle.

Sede immunitaria privilegiata Distretto dell'organismo inaccessibile alle risposte immunitarie o in grado di sopprimerle attivamente. La camera anteriore dell'occhio, i testicoli e il cervello sono esempi di sedi immunitarie privilegiate.

Segmenti di diversità (D) Brevi sequenze codificanti situate tra le regioni geniche variabili (V) e costanti (C) nei loci della catena pesante immunoglobulinica e del TCR β e γ che, insieme ai segmenti J, si ricombinano somaticamente con segmenti V durante la maturazione linfocitaria. La sequenza di DNA V(D)J risultante codifica per la regione V dei recettori per l'antigene.

Segmenti di unione (J) Brevi sequenze codificanti situate tra i segmenti genici variabile (V) e costante (C) in tutti i loci delle Ig e del TCR, che insieme ai segmenti D sono ricombinati somaticamente con segmenti V durante lo sviluppo linfocitario. La risultante sequenza ricombinata di DNA V(D)J codifica per le regioni V dei recettori per l'antigene.

Segmenti genici C (regione costante) Sequenze di DNA presenti nei loci del gene delle Ig e del TCR che codificano per le porzioni non variabili della catena pesante e leggera delle immunoglobuline e delle catene α, β, γ e δ del TCR.

Segmenti genici V Sequenze di DNA che codificano per il dominio variabile di una catena pesante o una catena leggera delle Ig o delle catene α, β, γ e δ del TCR. Ogni locus del recettore per l'antigene contiene differenti segmenti genici V, ciascuno dei quali nel corso della maturazione dei linfociti può ricombinarsi con segmenti D e J a valle per formare geni per recettori funzionali.

Selectine Famiglia di tre proteine strettamente correlate tra loro, in grado di legare i carboidrati e di mediare l'adesione dei leucociti alle cellule endoteliali. Le selectine sono glicoproteine transmembrana a catena singola con una struttura modulare simile contenente un dominio

lectinico extracellulare $Ca2^{+}$-dipendente. Le selectine comprendono la L-selectina (CD62L) espressa sui leucociti, la P-selectina (CD62P), espressa sulle piastrine e sull'endotelio attivato, e la E-selectina (CD62E), espressa sull'endotelio attivato.

Selezione negativa Processo attraverso cui i linfociti in via di maturazione che esprimono recettori per l'antigene specifici per gli antigeni self sono eliminati, contribuendo in tal modo al mantenimento della tolleranza al self. La selezione negativa di linfociti T in fase di maturazione (timociti) è quella meglio compresa e comporta il legame ad alta avidità tra il TCR di un linfocita T immaturo e le molecole MHC contenenti peptidi autologhi espresse sulle APC timiche; tale evento determina la morte apoptotica del linfocita.

Selezione positiva Processo attraverso cui i linfociti T che si sviluppano nel timo (timociti) e che esprimono un TCR in grado di legarsi a molecole MHC self vengono salvati dalla morte apoptotica, mentre i timociti i cui recettori non legano le molecole MHC vanno incontro a morte programmata. La selezione positiva assicura che i linfociti T che raggiungono la maturità siano ristretti per l'MHC self; i linfociti T $CD8^{+}$ riconoscono complessi di peptidi con molecole MHC di classe I mentre i linfociti T $CD4^{+}$ riconoscono complessi di peptidi con molecole MHC di classe II.

Sequenze di riconoscimento della ricombinazione Sequenze specifiche di DNA, adiacenti ai segmenti V, D e J nei loci dei recettori per l'antigene, riconosciute dalle componenti RAG-1/RAG-2 della ricombinasi V(D)J. I siti di riconoscimento sono rappresentati da sequenze altamente conservate di 7 nucleotidi, chiamate eptameri, localizzate in posizione adiacente alle sequenze codificanti V, D o J, seguita da un distanziatore di 12 o 23 nucleotidi non conservati e da una sequenza altamente conservata di 9 nucleotidi, detta nonamero.

Shock settico Complicanza grave e severa di infezioni batteriche che si estendono al torrente circolatorio (sepsi); è caratterizzata da collasso vascolare, coagulazione intravascolare disseminata e alterazioni metaboliche. Questa sindrome è dovuta agli effetti di componenti della parete batterica, come l'LPS o i peptidoglicani, che si legano ai TLR espressi da varie popolazioni cellulari e inducono l'espressione di citochine infiammatorie, tra cui il TNF e l'IL-1.

Siero Liquido privo di cellule che rimane quando il sangue o il plasma formano un coagulo. Gli anticorpi del sangue si ritrovano nella frazione del siero.

Sieroconversione Produzione, rilevabile nel siero, di anticorpi specifici per un microrganismo nel corso di un'infezione o in seguito a immunizzazione.

Sierologia Studio degli anticorpi presenti nel sangue (siero) e della loro iterazione con gli antigeni. Il termine sierologia è spesso utilizzato per riferirsi alla diagnosi di malattie infettive tramite il riscontro nel siero di anticorpi specifici per il microrganismo.

Sierotipo Sottogruppo antigenicamente distinto di una specie di microrganismi infettivi, distinguibile dagli altri sottogruppi mediante test sierologici (cioè ricercando i corrispondenti anticorpi nel siero). Le risposte immunitarie umorali verso un certo sierotipo di un microrganismo (per esempio il virus dell'influenza) possono non proteggere contro altri sierotipi.

Sindrome da immunodeficienza acquisita (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*, AIDS) Malattia causata dall'infezione da HIV, caratterizzata dalla deplezione dei linfociti T $CD4^{+}$, con conseguente grave deficit dell'immunità cellulo-mediata. Clinicamente, l'AIDS comprende infezioni opportunistiche, neoplasie, deperimento ed encefalopatia.

Sindrome da risposta infiammatoria sistemica (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*, SIRS) Sindrome caratterizzata da alterazioni sistemiche nei pazienti con infezione batterica disseminata. Nella forma più lieve, la SIRS consta di neutrofilia, febbre e un aumento delle proteine plasmatiche di fase acuta. Queste alterazioni sono stimolate da prodotti batterici come il

lipopolisaccaride e sono mediate dalle citochine dell'immunità innata. Nei casi più gravi, la SIRS può causare coagulazione intravascolare disseminata, sindrome da stress respiratorio e shock settico.

Sindrome da shock tossico Sindrome acuta caratterizzata da shock, esfoliazione cutanea, congiuntivite e diarrea, che si accompagna all'uso di assorbenti interni ed è causata da un superantigene derivante da *Staphylococcus aureus*.

Sindrome del linfocita nudo Malattia da immunodeficienza caratterizzata dalla mancata espressione di molecole MHC di classe II, che porta a difetti nella presentazione dell'antigene e nell'immunità cellulo-mediata. La malattia è causata da mutazioni nei geni che codificano per fattori di trascrizione che regolano l'espressione dei geni MHC di classe II.

Sindrome di Chédiak-Higashi Rara malattia genetica da immunodeficienza a trasmissione autosomica recessiva, causata da un difetto a livello dei granuli citoplasmatici di numerosi tipi cellulari, come i lisosomi dei neutrofili e dei macrofagi e i granuli dei CLT e delle cellule NK. I pazienti mostrano una ridotta resistenza alle infezioni da batteri piogeni.

Sindrome di DiGeorge Deficit selettivo dei linfociti T dovuto a una malformazione congenita che porta a un alterato sviluppo del timo, delle parotidi e di altre strutture che originano dalla terza e quarta tasca branchiale.

Sindrome di Wiskott-Aldrich Malattia ereditaria legata al cromosoma X caratterizzata da eczema, trombocitopenia (riduzione delle piastrine nel sangue) e immunodeficienza che si manifesta come aumentata suscettibilità alle infezioni batteriche. Il gene alterato codifica per una proteina citosolica coinvolta nelle cascate di trasduzione del segnale e nella regolazione del citoscheletro di actina.

Sindrome iper-IgM legata al cromosoma X Rara malattia da immunodeficienza causata da mutazioni nel gene di CD40L e caratterizzata dal mancato scambio isotipico delle catene pesanti dei linfociti B e da alterazioni dell'immunità cellulo-mediata. I pazienti soffrono di infezioni ricorrenti sia da parte di batteri piogeni sia da parte di microbi intracellulari.

Singenico Geneticamente identico. Tutti gli animali di un ceppo inbred o i gemelli monozigoti sono singenici.

Sintetasi dell'ossido nitrico Proteina appartenente alla famiglia degli enzimi che a partire dalla L-arginina sintetizzano l'ossido nitrico, un composto ad azione vasoattiva e microbicida. I macrofagi esprimono una forma inducibile di questo enzima, che viene attivata in risposta agli stimoli microbici e alle citochine.

Sistema immunitario L'insieme di molecole, cellule, tessuti e organi che complessivamente agiscono per fornire l'immunità (o protezione) verso gli agenti patogeni.

Sistema immunitario associato alle mucose Una componente del sistema immunitario che risponde e protegge contro microbi che entrano nell'organismo attraverso le superfici mucose, come il tratto gastrointestinale e il tratto respiratorio, ma anche deputato a mantenere la tolleranza agli organismi commensali che vivono all'esterno dell'epitelio della mucosa. Il sistema immunitario associato alle mucose è composto da tessuto linfoide organizzato, come le placche di Peyer, e anche da cellule diffuse nella lamina propria.

Sistema immunitario cutaneo Componenti dell'immunità innata e specifica presenti a livello cutaneo che agiscono in concerto in modo specializzato per rilevare e rispondere a patogeni presenti sulla superficie o all'interno della cute e mantenere l'omeostasi con i microbi commensali. Le componenti del sistema immunitario cutaneo comprendono cheratinociti, cellule di Langerhans, cellule dendritiche dermiche, linfociti intraepiteliali e linfociti del derma.

Sistema linfatico Sistema di vasi diffuso in tutto il corpo che raccoglie un fluido tissutale detto linfa, derivante dal plasma, e lo riporta al circolo sistemico sanguigno attraverso il dotto toracico.

Lungo questi vasi sono distribuiti i linfonodi che intrappolano e trattengono gli antigeni trasportati dalla linfa.

Sorveglianza immunologica Concetto che si basa sull'ipotesi che una delle funzioni fisiologiche del sistema immunitario sia quella di riconoscere e distruggere cloni di cellule trasformate prima che diano origine a tumori conclamati e di distruggere i tumori una volta che si siano formati. Questo termine è a volte utilizzato in senso generale per descrivere la funzione dei linfociti T nell'individuare e distruggere qualsiasi cellula, non necessariamente una cellula tumorale, che esprime un antigene estraneo (per esempio quando è infettata da un microrganismo intracellulare).

Southern blot Tecnica utilizzata per determinare l'organizzazione del DNA genomico in prossimità di un particolare gene. Il DNA viene tagliato in frammenti utilizzando endonucleasi di restrizione; i frammenti di diversa grandezza vengono separati mediante elettroforesi su gel e il DNA viene poi trasferito (*blotting*) su un foglio di nitrocellulosa o di nylon. La posizione e, quindi, la grandezza di un particolare frammento di DNA possono essere individuate con l'uso di una sonda di DNA radiomarcata con una sequenza omologa al frammento di DNA che si vuole individuare. (Per una descrizione dettagliata vedi l'Appendice IV.)

Specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) Metaboliti dell'ossigeno altamente reattivi che includono anioni superossido, radicali idrossilici e perossido di idrogeno, prodotti da fagociti attivati. Le specie reattive dell'ossigeno sono usate dai fagociti per formare ossialogenuri che danneggiano i batteri ingeriti. Possono anche essere rilasciati dalle cellule e promuovere la risposta infiammatoria o danneggiare i tessuti.

Specificità Caratteristica fondamentale del compartimento adattativo del sistema immunitario, indica la capacità delle risposte immuni di distinguere tra antigeni distinti o diversi epitopi di antigeni macromolecolari. Questa fine specificità è attribuibile ai recettori per l'antigene linfocitari che possono legarsi a una molecola, ma non a un'altra che presenti solo minime differenze strutturali con la prima.

STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) Membro di una famiglia di proteine che agiscono come molecole di trasduzione del segnale e di fattori di trascrizione in risposta al legame delle citochine ai recettori di tipo I e di tipo II. Le molecole STAT sono presenti nel citosol come monomeri inattivi e vengono reclutate a livello delle code intracellulari dei recettori per le citochine aggregati, dove vanno incontro a fosforilazione in tirosina da parte delle chinasi JAK. Le proteine STAT fosforilate dimerizzano e traslocano al nucleo dove si legano a sequenze specifiche nelle regioni promotrici di vari geni, stimolandone la trascrizione. Le diverse proteine STAT sono attivate da differenti citochine.

Superantigeni Proteine che si legano e attivano tutti i linfociti T che esprimono nel loro TCR una serie particolare o famiglia di geni V_β. I superantigeni sono presentati ai linfociti T in seguito al legame alle regioni non polimorfe delle molecole MHC di classe II delle APC, interagendo con regioni conservate del dominio V_β del TCR. Numerose enterotossine stafilococciche si comportano da superantigeni. La loro importanza risiede nella capacità di attivare un numero elevato di linfociti T, con conseguente produzione di grandi quantità di citochine e comparsa di una sindrome chiamata shock tossico, simile allo shock settico.

Superfamiglia del fattore di necrosi tumorale (*Tumor Necrosis Factor Superfamily*, TNFSF) Vasta famiglia di proteine transmembrana con omologia strutturale, che regolano varie funzioni nelle cellule rispondenti, incluse la proliferazione, la differenziazione, l'apoptosi e l'espressione di geni infiammatori. I membri della TNFSF formano generalmente omotrimeri, sia nel contesto della membrana plasmatica sia dopo il rilascio proteolitico dalla membrana e legano le molecole

omotrimeriche della TNFRSF, innescando una serie di cascate di segnali intracellulari (vedi l'Appendice II).

Superfamiglia del recettore del fattore di necrosi tumorale (*Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily*, TNFRSF) Vasta famiglia di proteine trnsmembrana con omologia strutturale che legano le proteine della superfamiglia del TNF e inducono segnali che regolano la proliferazione, la differenziazione, l'apoptosi e l'espressione di geni infiammatori (vedi l'Appendice II).

Superfamiglia delle immunoglobuline Vasta famiglia di proteine contenenti un motivo strutturale globulare, detto dominio immunoglobulinico, originariamente descritto nelle molecole anticorpali. Numerose proteine che svolgono un ruolo importante nel sistema immunitario sono membri di questa superfamiglia, comprese le Ig, i TCR, le molecole MHC, CD4 e CD8.

Syk Proteina chinasi citoplasmatica, simile alla proteina ZAP-70 delle cellule T, con ruolo critico nelle fasi precoci dell'attivazione antigene-specifica delle cellule B. Syk lega residui fosforilati di tirosine nella coda citoplasmatica delle catene Igα e Igβ del complesso BCR e fosforila a sua volta le proteine adattatrici che reclutano altre componenti della cascata del segnale.

Tasca per il peptide Porzione di molecola MHC che lega i peptidi per presentarli ai linfociti T. La tasca è composta da α-eliche accoppiate che poggiano su una base formata da un foglietto β-pieghettato costituito da 8 filamenti proteici. I residui polimorfi, che rappresentano gli aminoacidi che differiscono tra i diversi alleli MHC, sono collocati entro e attorno a questa tasca.

T-bet Fattore di trascrizione della famiglia T-box che promuove il differenziamento dei linfociti T naïve a linfociti T_H1.

TCR αβ È la forma più comune del TCR, espressa sia dai linfociti T $CD4^+$ sia dai $CD8^+$. Il TCR αβ riconosce gli antigeni peptidici legati a molecole MHC. Le catene α e β contengono sia regioni ipervariabili (V), che formano il sito di legame per l'antigene, sia regioni costanti (C). Le regioni V e C del TCR sono strutturalmente omologhe alle regioni V e C delle immunoglobuline.

TCR γδ È un tipo di TCR meno comune del TCR αβ ed è espresso da una sottopopolazione di linfociti T presenti soprattutto a livello delle barriere epiteliali. Nonostante il TCR γδ sia strutturalmente simile al TCR αβ, non è chiaro quali forme di antigene riconosca. Il TCR γδ non riconosce infatti i complessi peptidici presentati da molecole MHC polimorfiche.

Terapia antiretrovirale (*Anti-Retroviral*, ART) Combinazione chemioterapica per l'infezione da HIV, che consiste generalmente in due inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa in associazione con un inibitore della proteasi virale o con un inibitore non nucleosidico della trascrittasi inversa. ART può ridurre la titolazione virale plasmatica al di sotto di livelli rilevabili per oltre un anno e rallentare la progressione della malattia da HIV.

Terapia antiretrovirale altamente attiva (*Highly Active Anti-Retroviral Therapy*, HAART) Associazione chemioterapica utilizzata per il trattamento dell'infezione da HIV, composta da inibitori della trascrittasi inversa e della proteasi virale. La HAART può ridurre il titolo plasmatico del virus al di sotto della concentrazione rilevabile per lunghi periodi e rallentare la progressione dell'infezione.

Tessuto linfoide associato all'intestino (*Gut-Associated Lymphoid Tissue*, GALT) Formazioni di linfociti e cellule dendritiche nella mucosa del tratto gastrointestinale dove si sviluppa la risposta immunitaria specifica alla flora batterica intestinale e agli antigeni ingeriti (vedi anche **Tessuto linfoide associato alla mucosa**).

Tessuto linfoide associato alla mucosa (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*, MALT) Formazioni di linfociti, cellule dendritiche e altre cellule nella mucosa del tratto gastrointestinale e respiratorio che sono siti della risposta adattativa agli antigeni. Il tessuto linfoide associato alle mucose contiene linfociti intraepiteliali, soprattutto cellule T, e formazioni organizzate di

linfociti, spesso ricche di cellule B, sotto l'epitelio della mucosa, come le placche di Peyer nell'intestino e le tonsille nella faringe.

Tetramero Reagente usato per identificare i linfociti T che riconoscono in modo specifico un particolare complesso MHC-peptide. Il reagente consiste di quattro molecole MHC ricombinanti, biotinilate (generalmente di classe I) legate a una molecola di avidina marcata con un fluorocromo e caricate con un peptide. I linfociti T che legano il tetramero MHC possono essere individuati mediante la tecnica della citometria a flusso.

Timo Organo bilobato situato nel mediastino anteriore, sede della maturazione dei linfociti T da precursori derivati dal midollo osseo. Il timo è diviso in una corticale esterna e una midollare interna e contiene cellule epiteliali, macrofagi, cellule dendritiche e numerosi precursori dei linfociti T (timociti) in vari stadi di maturazione.

Timocita Precursore del linfocita T maturo presente nel timo.

Timocita doppio-negativo Sottopopolazione di linfociti T, in via di sviluppo nel timo, che non esprimono CD4 né CD8. La maggior parte dei timociti doppio-negativi si trova in un fase precoce di maturazione e non esprime recettori antigenici. Essi esprimeranno in seguito sia CD4 sia CD8 durante lo stadio intermedio di "doppia positività" prima dell'ulteriore maturazione a linfociti T singolo-positivi che esprimono solamente CD4 o CD8.

Timocita doppio-positivo Sottopopolazione di linfociti T in fase di sviluppo nel timo (timociti) che esprimono sia CD4 sia CD8 e sono in una fase intermedia di sviluppo. I timociti doppio-positivi esprimono anche il TCR e sono soggetti a processi di selezione che porteranno alla loro maturazione a linfociti T singolo-positivi che esprimono solo CD4 o CD8.

Timocita singolo-positivo Precursore del linfocita T in corso di maturazione nel timo che esprime molecole CD4 o CD8, ma non entrambe. I timociti singolo-positivi si ritrovano principalmente nella midollare e derivano da timociti doppio-positivi che esprimono sia CD4 sia CD8.

Tipizzazione tissutale Determinazione dei diversi alleli MHC espressi da un soggetto allo scopo di programmare il miglior abbinamento tra donatore e ricevente di un allotrapianto. La tipizzazione tissutale, detta anche tipizzazione HLA, è in genere ottenuta mediante il sequenziamento molecolare degli alleli HLA (basato sulla PCR), oppure mediante metodi sierologici (lisi dei linfociti del soggetto analizzato con pannello di anticorpi anti-HLA).

Tirosina chinasi di Bruton (*Bruton's Tyrosine Kinase*, Btk) Tirosina chinasi della famiglia Tec che riveste un ruolo essenziale nella maturazione dei linfociti B. Mutazioni nei geni che codificano per la Btk determinano una forma di agammaglobulinemia legata al cromosoma X, caratterizzata dalla riduzione del numero dei linfociti B dovuta all'incapacità dei precursori di maturare oltre lo stadio pre-B.

Tolleranza Mancata responsività dell'immunità specifica agli antigeni, a seguito dell'inattivazione o della morte dei linfociti specifici per l'antigene, indotte dall'esposizione all'antigene stesso. La tolleranza agli antigeni self è una caratteristica normale dell'immunità specifica, ma anche la tolleranza a un antigene estraneo può essere indotta in alcune particolari condizioni di esposizione all'antigene.

Tolleranza al self Non responsività del sistema immunitario specifico agli antigeni autologhi, in gran parte dovuta all'inattivazione o alla morte dei linfociti autoreattivi indotta dall'esposizione a tali antigeni. La tolleranza al self è una caratteristica fondamentale del sistema immunitario normale e la rottura di tale stato di tolleranza porta allo sviluppo di malattie autoimmuni.

Tolleranza centrale Forma di tolleranza indotta negli organi linfoidi primari ("centrali") a seguito del riconoscimento di antigeni autologhi da parte dei linfociti autoreattivi immaturi, che porta alla loro morte o inattivazione. La tolleranza centrale previene l'emergere di linfociti con recettori a elevata affinità per antigeni self ubiquitari che sono espressi nel midollo osseo o nel timo.

Tolleranza orale Soppressione delle risposte umorali e cellulo-mediate sistemiche a un antigene dopo la somministrazione orale di tale antigene, dovuta ad anergia dei linfociti T specifici per quell'antigene o alla produzione di citochine immunosoppressive quali il TGF-β. La tolleranza orale è un possibile meccanismo per la prevenzione delle risposte immunitarie agli antigeni alimentari e ai batteri che normalmente risiedono come commensali nel lume intestinale.

Tolleranza periferica Mancata responsività fisiologica ad antigeni self presenti nei tessuti secondari ma solitamente non negli organi linfoidi primari. La tolleranza periferica è indotta dal riconoscimento degli antigeni self in assenza di livelli adeguati dei costimolatori necessari per l'attivazione dei linfociti o dalla persistente e ripetuta stimolazione da parte di tali antigeni.

Tollerogeno Antigene che induce tolleranza immunologica, a differenza di un immunogeno che induce una risposta immunitaria. Numerosi antigeni possono essere sia tollerogeni sia immunogeni, a seconda di come vengono somministrati. Tra le situazioni nelle quali un antigene può comportarsi da tollerogeno ricordiamo la somministrazione senza adiuvanti di dosi elevate di proteine, i ligandi peptidici alterati e gli antigeni somministrati per via orale.

Topi knockout Topi con delezione mirata di uno o più geni, creati con tecniche di ricombinazione omologa. I topi knockout privi di geni funzionali che codificano per le citochine, i recettori della superficie cellulare, le molecole di trasduzione del segnale o i fattori di trascrizione hanno fornito ampie informazioni sul ruolo di tali molecole nel sistema immunitario.

Topo nudo Ceppo di topi privo del timo e pertanto dei linfociti T così come dei follicoli piliferi. Il topo nudo è stato usato sperimentalmente per definire il ruolo fisiopatologico dei linfociti T nell'ambito della risposta immunitaria.

Topo SCID Ceppo di topi in cui i linfociti B e T sono assenti a causa di un blocco precoce della maturazione dei loro precursori nel midollo osseo. I topi SCID sono portatori di una mutazione in una componente dell'enzima proteina chinasi DNA-dipendente, necessario per la riparazione delle rotture del DNA a doppio filamento. Il deficit di questo enzima porta a un'alterazione della ricombinazione dei segmenti genici delle Ig e del TCR e pertanto all'incapacità dei linfociti B e T di esprimere i recettori per l'antigene.

Topo transgenico Topo che esprime un gene estraneo introdotto nel genoma tramite l'inoculo di una sequenza di DNA nel pronucleo di un oocita fertilizzato di topo. Il transgene si inserisce in modo casuale nei punti di rottura del DNA ed è successivamente ereditato come tratto mendeliano semplice. Impiegando transgeni con sequenze regolatrici tessuto-specifiche, è possibile produrre topi che esprimono un particolare gene solo in determinati tessuti. I topi transgenici sono ampiamente utilizzati nella ricerca immunologica per studiare le funzioni delle diverse citochine, delle molecole della superficie cellulare e delle molecole di trasduzione del segnale intracellulare.

Topo transgenico per il recettore dei linfociti T Topo di un ceppo geneticamente modificato, che esprime catene α e β del TCR funzionali, modificate geneticamente e codificanti un TCR con un'unica e definita specificità antigenica. A causa dell'esclusione allelica dei geni del TCR endogeno, la maggior parte delle cellule T nel topo transgenico per il TCR hanno la stessa specificità antigenica, che è una caratteristica utile in diversi approcci sperimentali.

TRAF (*TNF Receptor – Associated Factors*) Famiglia di molecole adattatrici che interagiscono con i domini citoplasmatici di vari recettori della famiglia del recettore del TNF, tra cui il TNF-RII, il recettore per la linfotossina (Lt)-β e CD40. Ognuno di questi recettori contiene un motivo citoplasmatico che lega un diverso componente della famiglia TRAF, che a sua volta lega altre molecole della trasduzione del segnale che sfoceranno nell'attivazione dei fattori di trascrizione AP-1 e NF-κB. Un gene del virus di Epstein-Barr codifica per una proteina dotata di un dominio che lega le molecole TRAF; l'infezione con questo virus quindi simula i segnali indotti dal TNF e da CD40.

Trapianto Processo di trasferimento di cellule, tessuti od organi da un individuo a un altro o da una sede anatomica a un'altra dello stesso individuo. Il trapianto è usato per trattare patologie in cui è presente un disturbo funzionale di un tessuto o di un organo. L'ostacolo più grande al successo del trapianto da persona a persona è la reazione immunitaria di rigetto del trapiantato.

Trapianto allogenico Trapianto di organo o tessuto da un donatore della stessa specie del ricevente ma geneticamente non identico (detto anche allotrapianto).

Trapianto autologo Trapianto di tessuto od organo in cui il donatore e il ricevente sono la stessa persona. Nella pratica clinica sono eseguiti abitualmente trapianti autologhi di midollo osseo e di cute.

Trapianto di cellule staminali ematopoietiche Trapianto di cellule staminali ematopoietiche prelevate dal sangue o dal midollo osseo; è eseguito in ambito clinico come terapia per malattie ematopoietiche o linfopoietiche e le affezioni maligne ed è anche utilizzato in differenti esperimenti immunologici condotti su animali.

Trapianto di midollo osseo Vedi **Trapianto di cellule staminali ematopoietiche.**

Trapianto singenico Trapianto tra un donatore e un ricevente geneticamente identici. I trapianti singenici non vanno incontro a rigetto.

Trascrittasi inversa Enzima codificato dai retrovirus, per esempio l'HIV, che sintetizza una copia del DNA del genoma virale usando come stampo l'RNA virale. La trascrittasi inversa purificata è ampiamente usata in biologia molecolare allo scopo di clonare sequenze di DNA complementari all'RNA messaggero che codifica per un gene specifico. Gli inibitori della trascrittasi inversa sono utilizzati come farmaci per la terapia dell'infezione da HIV-1.

Trasduzione del segnale mediante JAK-STAT Via di trasduzione del segnale innescata dalle citochine che legano i recettori per le citochine di tipo I e di tipo II. Questa via coinvolge in sequenza l'attivazione delle tirosine chinasi Janus (JAK) associate al recettore, con la conseguente fosforilazione delle code citoplasmatiche del recettore, l'aggancio delle molecole STAT e la loro fosforilazione in tirosina da parte di JAK. La STAT fosforilata va incontro a dimerizzazione e traslocazione nucleare che ne permettono l'attivazione e l'interazione con le regioni regolatrici dei geni bersaglio.

Trasferimento adottivo Processo attraverso cui le cellule vengono trasferite da un individuo a un altro, o nuovamente nello stesso individuo, dopo espansione e attivazione *in vitro*. Il trasferimento adottivo è usato sperimentalmente per definire il ruolo di una particolare popolazione cellulare (per esempio i linfociti T) nell'ambito di una risposta immunitaria. In clinica, il trasferimento adottivo dei linfociti specifici per il tumore e di cellule dendritiche che presentano gli antigeni tumorali viene usato nelle terapie oncologiche sperimentali, mentre sono attualmente in corso studi clinici sul trasferimento adottivo di linfociti T regolatori.

Trasfusione Trapianto di cellule ematiche circolanti, piastrine o plasma da un individuo a un altro. La trasfusione si effettua per supplire alla perdita di sangue dovuta a emorragia o per curare la carenza di uno o più tipi di cellule ematiche dovuta all'inadeguata produzione o all'eccessiva distruzione.

Traslocazione cromosomica Alterazione in cui un segmento di un cromosoma viene trasferito a un altro. Molte patologie maligne dei linfociti sono associate a traslocazioni cromosomiche che coinvolgono un locus delle immunoglobuline o del TCR e un segmento cromosomico che contiene un oncogene.

Trasportatore associato con la processazione dell'antigene (*Transporter associated with Antigen Processing*, TAP) Trasportatore associato alla processazione dell'antigene che media il trasporto ATP-dipendente dei peptidi dal citosol alla sede di assemblaggio nel reticolo endoplasmatico delle molecole MHC di classe I. È una molecola eterodimerica composta dai polipeptidi TAP-1 e TAP-2, entrambi codificati da geni situati nell'MHC. Poiché i peptidi sono necessari per uno

stabile assemblaggio delle molecole MHC di classe I, gli animali con deficit genetico di TAP esprimono una quantità molto scarsa di molecole MHC di classe I sulla superficie cellulare, con conseguente ridotta maturazione e attivazione dei linfociti T $CD8^+$.

Ubiquitinazione Legame covalente a una proteina di molte coppie di un piccolo polipeptide detto ubiquitina. L'ubiquitinazione serve a segnalare la proteina per la degradazione proteolitica da parte dei lisosomi o del proteasoma, una tappa cruciale per la via di processazione e presentazione dell'antigene in classe I.

Vaccini a DNA Metodo di vaccinazione in cui un individuo viene inoculato con un plasmide batterico contenente un DNA complementare che codifica per un antigene proteico. I vaccini a DNA agiscono presumibilmente perché le cellule APC professionali sono transfettate *in vivo* dal plasmide ed esprimono peptidi immunogenici che evocano risposte specifiche. Inoltre, il DNA plasmidico contiene sequenze nucleotidiche CpG non metilate (tipiche del DNA batterico) che agiscono da adiuvanti.

Vaccini di antigene purificato (a subunità) Vaccini costituiti da antigeni purificati o da subunità di microrganismi. Esempi di questo tipo di vaccini comprendono i tossoidi difterico e tetanico, i polisaccaridici di *Pneumococcus* spp. e di *Haemophilus influenzae* e i vaccini formati da polipeptidi purificati del virus dell'epatite B e dell'influenza. I vaccini costituiti da antigeni purificati possono stimolare risposte anticorpali e risposte T helper, ma non generano risposte CTL efficaci.

Vaccino Preparazione di un antigene microbico, spesso associato ad adiuvanti, somministrata per indurre protezione nei confronti delle infezioni microbiche. L'antigene può essere sotto forma di microrganismi vivi ma attenuati, microrganismi uccisi o componenti macromolecolari purificate di microrganismi.

Vaccino sintetico Vaccino composto da antigeni ottenuti mediante la tecnica del DNA ricombinante. Sono attualmente in uso vaccini sintetici contro il virus dell'epatite B e dell'herpes simplex.

Vaccino virale vivo Vaccino costituito da una forma di virus vitale ma non patogena (attenuata). I virus attenuati hanno mutazioni che interferiscono con il ciclo vitale del virus o con la patogenesi. Poiché i vaccini a virus vivi in realtà infettano le cellule del ricevente, essi possono stimolare efficacemente le risposte immunitarie, come la risposta dei CTL, che sono ottimali per la protezione nei confronti del virus non modificato. Un vaccino attenuato di comune utilizzo è il vaccino Sabin contro il poliovirus.

Vaiolo Malattia causata dal virus del vaiolo. Il vaiolo è stata la prima malattia infettiva per cui si è dimostrata la possibilità di prevenzione mediante vaccinazione e la prima malattia a essere completamente eradicata da un programma mondiale di vaccinazione.

Variazione antigenica Processo mediante il quale gli antigeni espressi dai microbi possono cambiare attraverso vari meccanismi genetici, consentendo in tal modo al microbo di evadere le risposte immunitarie. Un esempio di variazione antigenica è la modificazione delle proteine di superficie emoagglutinina e neuroaminidasi del virus influenzale, che rende necessaria la generazione di nuovi vaccini ogni anno.

Venule a endotelio alto (*High Endothelial Venules*, HEV) Venule specializzate che sono il sito di migrazione dei linfociti dal sangue allo stroma dei tessuti linfoidi secondari. Le HEV sono rivestite da cellule endoteliali cuboidali che protrudono nel lume vasale ed esprimono molecole di adesione specifiche coinvolte nel legame tra i linfociti T e B naïve e della memoria centrale.

Vescicola di classe II (*Class II Vesicle*, CIIV) Organello associato alle membrane, identificato nei linfociti B murini, che svolge un importante ruolo nella via di presentazione dell'antigene alle molecole MHC di classe II. La CIIV è simile al compartimento MHC di classe II (MIIC) identificato in altre cellule e contiene tutte le componenti necessarie per la formazione dei

complessi peptide-MHC di classe II, come gli enzimi che degradano gli antigeni proteici, le molecole di classe II, la catena invariante e l'HLA-DM.

Via alternativa di attivazione del complemento Via di attivazione del sistema del complemento indipendente dalla presenza di anticorpi, che agisce quando la proteina C3b si lega alle superfici cellulari microbiche. La via alternativa fa parte del sistema dell'immunità innata e media la risposta infiammatoria alle infezioni nonché la lisi diretta dei microrganismi.

Via classica di attivazione del complemento Via di attivazione del sistema del complemento iniziata dal legame del complesso antigene-anticorpo alla molecola C1 che innesca una cascata di attivazione proteolitica che coinvolge molte altre proteine del complemento. La via classica del complemento è un braccio effettore del compartimento umorale dell'immunità specifica che genera mediatori dell'infiammazione, opsonine che facilitano la fagocitosi degli antigeni e complessi litici che distruggono le cellule.

Via lectinica di attivazione del complemento Via di attivazione del complemento innescata dal legame dei polisaccaridi microbici alle lectine circolanti, come la MBL. La MBL è strutturalmente simile al C1q e, come quest'ultimo, attiva il complesso enzimatico C1r-C1s o attiva un'altra serina esterasi, nota come serina esterasi associata alla MBL. Le tappe successive della via lectinica, a partire dalla scissione del C4, sono le stesse della via classica.

Virus Microrganismo intracellulare obbligato composto da un semplice genoma di acido nucleico contenuto all'interno di un capside proteico, talora a sua volta circondato da un involucro lipidico. Esistono numerosi virus patogeni che causano un'ampia varietà di malattie negli animali. La risposta umorale ai virus può essere efficace nel bloccare l'infezione delle cellule, mentre le cellule NK e i CTL sono necessari per uccidere le cellule già infettate.

Virus dell'immunodeficienza della scimmia Lentivirus strettamente correlato all'HIV-1, che provoca una malattia simile all'AIDS nelle scimmie.

Virus dell'immunodeficienza umana (*Human Immunodeficiency Virus*, HIV) Agente eziologico dell'AIDS. L'HIV è un retrovirus che infetta una varietà di tipi cellulari, tra cui linfociti T helper che esprimono il CD4, macrofagi e cellule dendritiche; causa una progressiva distruzione del sistema immunitario.

Virus di Epstein-Barr (*Epstein-Barr Virus*, EBV) Virus a DNA a doppia elica della famiglia degli herpesvirus; è l'agente eziologico della mononucleosi infettiva ed è associato ad alcune neoplasie dei linfociti B e a carcinomi rinofaringei. L'EBV infetta i linfociti B e alcune cellule epiteliali tramite un legame specifico con il recettore del complemento di tipo 2 (CR2 o CD21).

Western blot Tecnica immunologica per determinare la presenza di una proteina in un campione biologico. Il metodo implica la separazione di proteine nel campione tramite elettroforesi, il trasferimento delle proteine dal gel elettroforetico a una membrana di supporto (*blotting*) e, infine, la rilevazione della proteina tramite un anticorpo specifico marcato con un enzima o con un radio isotopo.

XBP-1 Fattore di trascrizione implicato nella risposta allo stress cellulare indotto dall'accumulo di proteine mal ripiegate (*Unfolded Protein Response*; UPR) e nel differenziamento delle plasmacellule.

Xenoantigene Antigene espresso da un trapianto di una specie diversa dal ricevente.

Xenoreattivo Termine che descrive un linfocita T o anticorpo che riconosce un antigene in un trapianto proveniente da una specie diversa (ossia uno xenoantigene). I linfociti T possono riconoscere una molecola MHC xenogenica o un peptide derivato da una proteina xenogenica legata a una molecola MHC self.

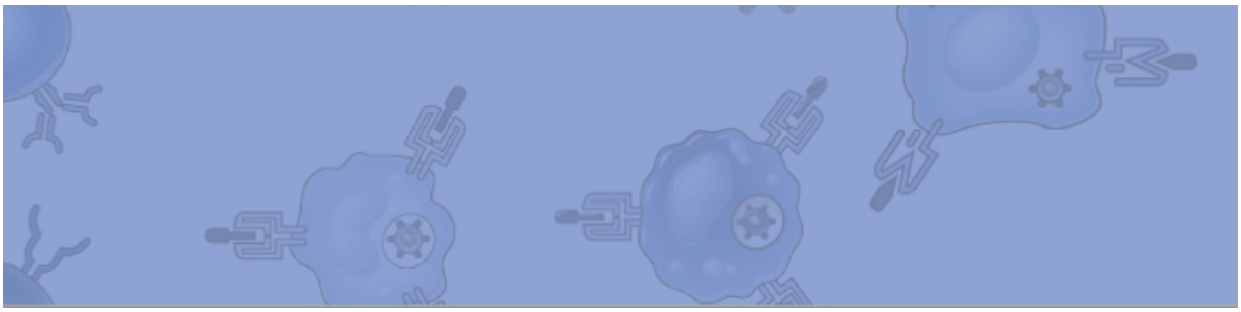
Xenotrapianto (trapianto xenogenico) Trapianto di organo o tessuto derivato da una specie differente da quella del ricevente. Il trapianto xenogenico (per esempio dal maiale all'uomo) non è ancora una pratica diffusa a causa dei particolari problemi correlati al rigetto immunologico.

ZAP-70 Proteina tirosina chinasi citoplasmatica della famiglia Src, simile a Syk nelle cellule B, che svolge un ruolo critico durante le prime fasi di trasduzione del segnale in seguito all'attivazione dei linfociti T da parte dell'antigene. ZAP-70 si lega a residui fosforilati di tirosina presenti nella coda citoplasmatica della catena ζ e CD3 del TCR e, a sua volta, fosforila proteine adattatrici che reclutano altri componenti della cascata di trasduzione del segnale.

Zona marginale Regione periferica dei follicoli linfatici della milza che contiene i macrofagi ed è particolarmente efficiente nel captare gli antigeni polisaccaridici. Tali antigeni possono persistere per periodi prolungati sulla superficie dei macrofagi della zona marginale, dove sono riconosciuti dai linfociti B, o possono essere trasportati all'interno dei follicoli.

Appendice

II



CITOCHINE

Citochina e subunità	Principale fonte cellulare	Recettore della citochina e subunità*	Principali bersagli cellulari e effetti biologici
Membri della famiglia delle citochine di tipo I			
Interleuchina-2 (IL-2)	Linfociti T	CD25 (IL-2Rα) CD122 (IL-2Rβ) CD132 (γ_C)	Linfociti T: proliferazione e differenziazione in linfociti effettori e della memoria; promuove lo sviluppo dei linfociti T regolatori, sopravvivenza e funzione Cellule NK: proliferazione, attivazione Linfociti B: proliferazione, sintesi di anticorpi (*in vitro*)
Interleuchina-3 (IL-3)	Linfociti T	CD123 (IL-3Rα) CD131 (β_C)	Progenitori ematopoietici immaturi: induce la maturazione di tutti gli stipiti ematopoietici
Interleuchina-4 (IL-4)	Linfociti T $CD4^+$ (T_H2), mastociti	CD124 (IL-4Rα) CD132 (γ_C)	Linfociti B: scambio isotipico a IgE Linfociti T: differenziazione in T_H2, proliferazione Macrofagi: attivazione alternativa e inibizione dell'attivazione classica dipendente dall'IFN-γ Mastociti:

			proliferazione (*in vitro*)
Interleuchina-5 (IL-5)	Linfociti T $CD4^+$ (T_H2), cellule linfoidi innate di gruppo 2	CD125 (IL-5Rα) CD131 (β_c)	Eosinofili: attivazione, aumentata produzione Linfociti B: proliferazione, produzione di IgA (*in vitro*)
Interleuchina-6 (IL-6)	Macrofagi, cellule endoteliali, linfociti T	CD126 (IL-6Rα) CD130 (gp130)	Fegato: sintesi di proteine di fase acuta Linfociti B: proliferazione di cellule che producono anticorpi
Interleuchina-7 (IL-7)	Fibroblasti, cellule stromali del midollo osseo	CD127 (IL-7R) CD132 (γ_c)	Progenitori linfoidi immaturi: proliferazione di progenitori T e B precoci Linfociti T: sopravvivenza di cellule naïve e della memoria
Interleuchina-9 (IL-9)	Linfociti T $CD4^+$	CD129 (IL-9R) CD132 (γ_c)	Mastociti, linfociti B, linfociti T e cellule tissutali: sopravvivenza e attivazione
Interleuchina-11 (IL-11)	Cellule stromali del midollo osseo	IL-11Rα CD130 (gp130)	Produzione di piastrine
Interleuchina-12 (IL-12): IL-12A (p35) L-12B (p40)	Macrofagi, cellule dendritiche	CD212 (IL-12Rβ1) IL-12Rβ2	Linfociti T: differenziazione in T_H1 Cellule NK e linfociti T: sintesi di IFN-γ, aumentata capacità citotossica
Interleuchina-13 (IL-13)	Linfociti T $CD4^+$ (T_H2), linfociti NK-T, cellule linfoidi innate di gruppo 2, mastociti	CD213a1 (IL-13Rα1) CD213a2 (IL-13Rα2) CD132 (γ_c)	Linfociti B: scambio isotipico a IgE Cellule epiteliali: aumentata produzione di

			muco Fibroblasti: aumentata sintesi di collageno Macrofagi: attivazione alternativa
Interleuchina-15 (IL-15)	Macrofagi, altri tipi di cellule	IL-15Rα CD122 (IL-2Rβ) CD132 (γ_C)	Cellule NK: proliferazione Linfociti T: sopravvivenza e proliferazione dei linfociti $CD8^+$ della memoria
Interleuchina-16 (IL-16)	Linfociti T, mastociti, eosinofili, cellule epiteliali	CD4	Linfociti T $CD4^+$, monociti ed eosinofili: chemoattraente
Interleuchina-17A (IL-17A) Interleuchina-17F (IL-17F)	Linfociti T $CD4^+$ (T_H17), cellule linfoidi innate di gruppo 3	CD217 (IL-17RA) IL-17RC	Cellule endoteliali: aumentata produzione di chemochine Macrofagi: aumentata produzione di chemochine e citochine Cellule epiteliali: produzione di GM-CSF e G-CSF
Interleuchina-21 (IL-21)	Linfociti T_H2, linfociti T_H17, linfociti T_{FH}	CD360 (IL-21R) CD132 (γ_C)	Linfociti B: attivazione, proliferazione, differenziazione Linfociti T_{FH}: sviluppo Linfociti T_H17: aumento Cellule NK: maturazione funzionale
Interleuchina-23 (IL-23): IL-23A (p19), IL-12B (p40)	Macrofagi, cellule dendritiche	IL-23R CD212 (IL-12Rβ1)	Linfociti T: differenziazione ed espansione delle cellule T_H17
Interleuchina-25 (IL-25; IL-	Linfociti T, mastociti,	IL-17RB	Linfociti T e altri

17E)	eosinofili, macrofagi, cellule epiteliali mucosali		tipi cellulari: espressione di IL-4, IL-5, IL-13
Interleuchina-27 (IL-27) IL-27 p28 EBI3 (IL-27B)	Macrofagi, cellule dendritiche	IL-27Rα CD130 (gp130)	Linfociti T: inibizione dei linfociti T_H1 Cellule NK: sintesi di IFN-γ?
Interleuchina-31 (IL-31)	Linfociti T_H2	IL-31RA OSMR CD130 (gp130)	Non definito
Fattore delle cellule staminali (ligando di c-Kit)	Cellule stromali del midollo osseo	CD117 (KIT)	Cellule staminali ematopoietiche pluripotenti: induce la maturazione di tutti gli stipiti ematopoietici
CSF dei granulociti-monociti (GM-CSF)	Linfociti T, macrofagi, cellule endoteliali, fibroblasti	CD116 (GM-CSFRα) CD131 (β_C)	Progenitori immaturi e già indirizzati, macrofagi maturi: induce la maturazione dei granulociti e dei monociti, attivazione dei macrofagi
CSF dei monociti (M-CSF, CSF1)	Macrofagi, cellule endoteliali, cellule del midollo osseo, fibroblasti	CD115 (CSF1R)	Progenitori ematopoietici indirizzati: induce la maturazione dei monociti
CSF dei granulociti (G-CSF, CSF3)	Macrofagi, fibroblasti, cellule endoteliali	CD114 (CSF3R)	Progenitori ematopoietici indirizzati: induce la maturazione dei granulociti
Membri della famiglia delle citochine di tipo II			
IFN-α (proteine diverse)	Cellule dendritiche plasmacitoidi, macrofagi	IFNAR1 CD118 (IFNAR2)	Tutte le cellule: stato antivirale, aumento dell’espressione di molecole MHC di

			classe I Cellule NK: attivazione
IFN-β	Fibroblasti, cellule dendritiche plasmacitoidi	IFNAR1 CD118 (IFNAR2)	Tutte le cellule: stato antivirale, aumento dell'espressione delle molecole MHC di classe I Cellule NK: attivazione
Interferone-γ (IFN-γ)	Linfociti T (T_H1, linfociti T $CD8^+$) Cellule NK	CD119 (IFNGR1) IFNGR2	Macrofagi: attivazione classica (aumento della capacità microbicida) Linfociti B: scambio isotipico verso le sottoclassi di immunoglobuline che opsonizzano e fissano il complemento (nel topo) Linfociti T: differenziazione a T_H1 Cellule varie: aumento dell'espressione delle molecole MHC di classe I e II, aumento del processamento e della presentazione dell'antigene ai linfociti T
Interleuchina-10 (IL-10)	Macrofagi, linfociti T (principalmente linfociti T regolatori)	CD210 (IL-10Rα) CD210B (IL-10Rβ)	Macrofagi, cellule dendritiche: inibizione dell'espressione di IL-12 e dell'espressione di molecole costimolatorie e MHC di classe II
Interleuchina-19 (IL-19)	Macrofagi	IL-20Rα IL-10Rβ	Macrofagi: stimola

			la secrezione di IL-1 e TNF Cheratinociti: proliferazione
Interleuchina-22 (IL-22)	Linfociti T_H17	IL-22Rα1 IL-10Rβ2 *o* IL-22α2 IL-10Rβ2	Cellule epiteliali: produzione di defensine, aumento della funzione di barriera Epatociti: sopravvivenza
Interleuchina-26 (IL-26)	Linfociti T, monociti	IL20R1 IL-10R2	Non definito
Interferone-ls (interferone di tipo III)	Cellule dendritiche	IFNLR1 (IL-28Rα) CD210B (10Rβ2)	Cellule epiteliali: stato antivirale
Fattore che inibisce la leucemia (LIF)	Trofoectoderma embrionico, Cellule stromali del midollo osseo	CD118 (LIFR) CD130 (gp130)	Cellule staminali: blocco nella differenziazione
Oncostatina M	Cellule stromali del midollo osseo	OSMR CD130 (gp130)	Cellule endoteliali: regolazione della produzione di citochine ematopoietiche Cellule tumorali: inibizione della proliferazione
Citochine della superfamiglia del TNF[†]			
Fattore di necrosi tumorale (TNF, TNFSF1)	Macrofagi, cellule NK, linfociti T	CD120a (TNFRSF1) *o* CD120b (TNFRSF2)	Cellule endoteliali: attivazione (infiammazione, coagulazione) Neutrofili: attivazione; Ipotalamo: febbre Muscolo, grasso: catabolismo (cachessia)
Linfotossina-α (LTα, TNFSF1)	Linfociti T, linfociti B	CD120a (TNFRSF1) *o* CD120b (TNFRSF2)	Come il TNF
Linfotossina-αβ (LTαβ)	Linfociti T, cellule NK, cellule B follicolari, cellule linfoidi induttrici	LTβR *o* HVEM	Cellule stromali dei tessuti linfoidi e cellule dendritiche

			follicolari: espressione di chemochine e organogenesi linfoide
BAFF (CD257, TNFSF13B)	Cellule dendritiche, monociti, cellule dendritiche follicolari Linfociti B	BAFF-R (TNFRSF13C) *o* TACI (TNFRSF13B) *o* BCMA (TNFRSF17)	Linfociti B: sopravvivenza, proliferazione
APRIL (CD256, TNFSF13)	Linfociti T, cellule dendritiche, monociti, cellule dendritiche follicolari	TACI (TNFRSF13B) *o* BCMA (TNFRSF17)	Linfociti B: sopravvivenza, proliferazione
Osteoprotegerina (OPG, TNFRSF11B)	Osteoblasti	RANKL	Cellule precorritrici degli osteoclasti: inibisce la differenziazione a osteoclasti
Citochine della famiglia dell'IL-1			
Interleuchina-1α (IL-1α)	Macrofagi, cellule dendritiche, fibroblasti, cellule endoteliali, cheratinociti, epatociti	CD121a (IL-1R1) IL-1RAP *o* CD121b (IL-1R2)	Cellule endoteliali: attivazione (infiammazione, coagulazione) Ipotalamo: febbre Fegato: sintesi di proteine di fase acuta
Interleuchina-1β (IL-1βb)	Macrofagi, cellule dendritiche, fibroblasti, cellule endoteliali, cheratinociti, epatociti	CD121a (IL-1R1) IL-1RAP o CD121b (IL-1R2)	Cellule endoteliali: attivazione (infiammazione, coagulazione) Ipotalamo: febbre Fegato: sintesi di proteine di fase acuta Linfociti: differenziazione di T_H17
Antagonista del recettore dell'interleuchina-1 (IL-1Ra)	Macrofagi	CD121a (IL-1R1) IL-1RAP	Cellule varie: antagonista competitivo dell'IL-1
Interleuchina-18 (IL-18)	Monociti, macrofagi, cellule	CD218a (IL-18Rα)	Cellule NK e

	dendritiche, cellule di Kupffer, cheratinociti, condrociti, fibroblasti sinoviali, osteoblasti	CD218b (IL-18Rβ)	linfociti T: sintesi di IFN-γ Monociti: espressione di GM-CSF, TNF, IL-1β Neutrofili: attivazione e rilascio di citochine
Interleuchina-33 (IL-33)	Cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, cheratinociti, fibroblasti	ST2 (IL1RL1); Proteina accessoria del recettore di IL-1 (IL1RAP)	Linfociti T: differenziazione di T_H2 ILCs: attivazione di ILC di gruppo 2
Altre citochine			
Fattore di crescita trasformante-β (TGF-β)	Linfociti T (soprattutto Tregs), macrofagi, altri tipi cellulari	TGF-β R1 TGF-βR2 TGF-β R3	Linfociti T: inibizione della proliferazione e funzioni effettrici; differenziazione di T_H17 e cellule Treg Linfociti B: inibizione della proliferazione; produzione di IgA Macrofagi: inibizione dell'attivazione; stimolazione dei fattori angiogenici Fibroblasti: sintesi incrementata del collagene

APRIL (*A Proliferation-Inducing Ligand*), ligando che induce proliferazione; BAFF (*B cell Activating Factor belonging to the TNF Family*), fattore di attivazione dei linfociti B appartenente alla famiglia del TNF; BCMA (*B Cell Maturation protein*), proteina di maturazione dei linfociti B; CSF (*Colony Stimulating Factor*), fattore di stimolazione delle colonie; HVEM (*Herpes Virus Entry Mediator*), mediatore di ingresso dell'herpesvirus; IFN (*Interferon*), interferone; MHC (*Major Histocompatibility Complex*), complesso maggiore di istocompatibilità; cellula NK, cellula natural killer; OSMR (*OncoStatin M Receptor*), recettore dell'oncostatina M; RANK (*Receptor Activator for Nuclear Factor κb*), recettore di attivazione per l'NFκb; RANKL (*RANK Ligand*), ligando di RANK; TACI (*Transmembrane Activator and Calcium modulator and cyclophilin ligand Interactor*), attivatore transmembrana e modulatore del calcio e ligando interagente con la ciclofillina; TNF (*Tumor Necrosis Factor*), fattore di necrosi tumorale; TNFSF (*TNF SuperFamily*), superfamiglia del TNF; TNFRSF (*TNF Receptor SuperFamily*), superfamiglia dei recettori del TNF.

*La maggior parte dei recettori per le citochine sono dimeri o trimeri composti da diverse catene

polipeptidiche, alcune delle quali sono condivise da recettori per citochine differenti. Per ogni citochina è riportato il set di polipeptidi che costituiscono il recettore funzionale (che include il legame alla citochina e la trasduzione del segnale). Non sono indicate le funzioni di ogni subunità polipeptidica.

†Tutti i membri della superfamiglia del TNF (TNFSF) sono espressi come proteine di superficie transmembrana, ma nella tabella sono indicate solo le sottopopolazioni che sono principalmente attive come citochine solubili, rilasciate dopo il taglio proteolitico. Altri membri della TNFSF che funzionano principalmente nella forma di membrana e non sono strettamente citochine non sono riportati in tabella. Queste proteine di membrana e i recettori TNFRSF che legano includono: OX40L (CD252, TNFSF4):OX40 (CD134, TNFRSF4); CD40L (CD154, TNFSF5):CD40 (TNFRSF5); FasL (CD178, TNFSF6):Fas (CD95, TNFRSF6); CD70 (TNFSF7):CD27 (TNFRSF27); CD153 (TNFSF8):CD30 (TNFRSF8); TRAIL (CD253, TNFSF10):TRAIL-R (TNFRSF10A-D); RANKL (TNFSF11):RANK (TNFRSF11); TWEAK (CD257, TNFSF12):TWEAKR (CD266, TNFRSF12); LIGHT (CD258, TNFSF14):HVEM (TNFRSF14); GITRL (TNFSF18):GITR (TNFRSF18); 4-IBBL:4-IBB (CD137).

Appendice III

CARATTERISTICHE DELLE PRINCIPALI MOLECOLE CD

La seguente tabella riporta alcune delle molecole CD a cui si fa riferimento nel testo. A molte citochine e recettori per le citochine è stata assegnata la nomenclatura CD, ma facciamo riferimento a questi con il nome, più descrittivo, delle singole citochine. Una lista completa e aggiornata delle molecole CD è disponibile sul sito http://www.hcdm.org.

Numero CD (Altri nomi)	Sinonimi	Struttura molecolare, famiglia	Principale fonte cellulare	Funzioni note o proposte
CD1a-d		49 kD; superfamiglia delle Ig con struttura simile a MHC di classe I; associate alla β_2-microglobulina	Timociti, cellule dendritiche (incluse le cellule di Langerhans)	Presentazione di antigeni non peptidici (lipidi e glicolipidi) ad alcuni linfociti T
CD1e		28 kD; con struttura simile a MHC di classe I; associata alla β_2-microglobulina	Cellule dendritiche	Identico a CD1a
CD2 (LFA-2)		50 kD; superfamiglia delle Ig	Linfociti T, cellule NK	Molecole di adesione (lega CD58); attivazione dei linfociti T; lisi dei CTL e delle NK cellulo-mediata

CD3γ	25-28 kD; associata a CD3δ e CD3ε nel complesso TCR; superfamiglia delle Ig; ITAM nella coda citoplasmatica	Linfociti T	Espressione sulla superficie cellulare e trasduzione del segnale da parte del complesso TCR
CD3δ	20 kD; associata a CD3δ e CD3ε nel complesso TCR; superfamiglia delle Ig; ITAM nella coda del complesso TCR citoplasmatica	Linfociti T	Espressione sulla superficie cellulare e trasduzione del segnale da parte del complesso TCR
CD3ε	20 kD; associata a CD3δ e CD3ε nel complesso TCR; superfamiglia delle Ig; ITAM nella coda citoplasmatica	Linfociti T	Espressione sulla superficie cellulare e trasduzione del segnale da parte del complesso TCR
CD4	55 kD; superfamiglia delle Ig	Linfociti T ristretti per l’MHC di classe II, sottopopolazioni di macrofagi	Corecettore coinvolto nell’attivazione antigenica dei linfociti T ristretti per MHC di classe II (si lega a molecole MHC di classe II); sviluppo dei timociti; recettore primario per HIV
CD5	67 kD; famiglia dei recettori scavenger	Linfociti T; sottopopolazione di linfociti B B-1	Molecole di trasduzione del segnale; lega CD72
CD8α	34 kD; espresso come omodimero	Linfociti T ristretti per MHC di classe I; sottopopolazioni	Corecettore coinvolto nell’attivazione

		o eterodimero con CD8β	di cellule dendritiche	antigenica dei linfociti T ristretti per MHC di classe I (si lega alle molecole MHC di classe I); sviluppo dei timociti
CD8β		34 kD; espresso come eterodimero con CD8α; superfamiglia delle Ig	Linfociti T ristretti per MHC di classe I	Identico a CD8α
CD10		100 kD, proteina di membrana di tipo II	Linfociti B immaturi e alcuni maturi; progenitori linfoidi, granulociti	Metalloproteinasi; funzione sconosciuta nel sistema immunitario
CD11a (Catena α di LFA-1)		180 kD; non covalentemente legato a CD18 per formare l'integrina LFA-1	Leucociti	Adesione cellula:cellula; si lega a ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102) e ICAM-3 (CD50)
CD11b (Mac-1; CR3)	Mac-1; Mo1; CR3 (recettore di iC3b); subunità integrinica α_M	165 kD; non covalentemente legato a CD18 per formare l'integrina Mac-1	Granulociti, monociti/macrofagi, cellule dendritiche, cellule NK	Fagocitosi di particelle opsonizzate da iC3b; adesione dei neutrofili e dei monociti all'endotelio (si lega a CD54) e alle proteine della matrice extracellulare
CD11c (p150,95; catena α del CR4)		145 kD; non covalentemente legato a CD18 per formare l'integrina p150,95	Monociti, macrofagi, granulociti, cellule NK	Funzioni simili a CD11b
CD14		53 kD; legata al	Cellule dendritiche;	Si lega al

	GPI	monociti; macrofagi; granulociti	complesso tra l’LPS e la proteina legante l’LPS e favorisce il riconoscimento di LPS da parte di TLR4; necessario per l’attivazione dei macrofagi indotta dall’LPS
CD16a (FcγRIIIA)	50-70 kD; proteina transmembrana, superfamiglia delle Ig	Cellule NK, macrofagi	Lega la porzione Fc delle IgG; fagocitosi; citotossicità mediata da anticorpi
CD16b (FcγRIIIB)	50 kD; legata a GPI; superfamiglia delle Ig	Neutrofili	Lega la porzione Fc delle IgG; sinergia con FcγRII nell’attivazione dei neutrofili mediata da immunocomplessi
CD18	95 kD; non covalentemente legato a CD11a, CD11b o CD11c per formare le integrine β_2	Leucociti	Vedi CD11a, CD11b, CD11c
CD19	95 kD; superfamiglia delle Ig	La maggior parte dei linfociti B	Attivazione dei linfociti B; forma un complesso corecettoriale con CD21 e CD81 che trasduce un segnale che sinergizza con quelli trasdotti dal complesso BCR
CD20	35-37 kD; famiglia delle	Linfociti B	? Ruolo nell’attivazione o

	tetraspanine (TM4SF)		nella regolazione dei linfociti B; canale ionico del calcio
CD21 (CR2; recettore di C3d)	145 kD; famiglia dei regolatori dell'attivazione del complemento	Linfociti B maturi, cellule follicolari dendritiche	Recettore per il frammento C3d del complemento; forma un complesso corecettoriale con CD19 e CD81, che trasduce segnali di attivazione nei linfociti B; recettore del virus di Epstein-Barr
CD22	130-140 kD; superfamiglia delle IgG; famiglia delle sialoadesine; ITIM nella coda citoplasmatica	Linfociti B	Regolazione dell'attivazione dei linfociti B, molecola di adesione
CD23 (FcεRIIB)	45 kD; lectina di tipo C	Linfociti B attivati, monociti, macrofagi	Recettore a bassa affinità per Fcε, indotto dall'IL-4; funzione non chiara
CD25 (Catena α del recettore di IL-2)	55 kD; associato non covalentemente con le catene IL-2Rb (CD122) e IL-2Rg (CD132) per formare il recettore ad alta affinità dell'IL-2	Linfociti B e T attivati; linfociti T regolatori (Treg)	Si lega all'IL-2 e promuove le risposte a basse concentrazioni di IL-2
CD28	Omodimero di catene di 44 kD; superfamiglia delle Ig	Linfociti T (tutti i linfociti $CD4^+$ e >50% dei linfociti $CD8^+$ nell'uomo;	Recettore T per le molecole costimolatorie

			tutti i linfociti T maturi nel topo)	CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2)
CD29		130 kD; non covalentemente legati alle catene CD49a-d per formare le integrine VLA (β_1)	Linfociti T, linfociti B, monociti, granulociti	Adesione leucocitaria alle proteine della matrice extracellulare e all'endotelio (vedi CD49)
CD30 (TNFRSF8)		120 kD; superfamiglia dei recettori del TNF	Linfociti T e B attivati, cellule NK, monociti, cellule di Reed-Sternberg nel morbo di Hodgkin	Non note
CD31 (Molecola di adesione cellulare piastrinico-endoteliale 1, PECAM-1)		130-140 kD; superfamiglia delle Ig	Piastrine, monociti, granulociti, linfociti B, cellule endoteliali	Molecola di adesione coinvolta nella trasmigrazione leucocitaria attraverso l'endotelio
CD32 (FcγRII)		40 kD; superfamiglia delle Ig; ITIM nella coda citoplasmatica; le forme A, B, C sono prodotti di geni diversi ma omologhi	Linfociti B, macrofagi, cellule dendritiche granulociti	Recettore Fc per IgG aggregate; agisce da recettore inibitorio che blocca i segnali di attivazione nei linfociti B ed in altre cellule
CD34		105-120 kD; sialomucina	Precursori delle cellule emopoietiche; cellule endoteliali nelle venule a endotelio alto	? Ruolo nell'adesione cellula-cellula
CD35 (Recettore del complemento di tipo 1, CR1)	CR1; recettore del C3b	190-285 kD (quattro prodotti di alleli polimorfi); famiglia dei	Granulociti, monociti, eritrociti, linfociti B, cellule dendritiche	Lega C3b e C4b; promuove la fagocitosi di particelle rivestite da C3b o C4b e di

	regolatori degli attivatori del complemento	follicolari, alcuni linfociti T	immunocomplessi; regola l’attivazione del complemento
CD36	85-90 kD	Piastrine, monociti e macrofagi maturi, cellule endoteliali	Recettore scavenger per le lipoproteine a bassa densità ossidate; adesione piastrinica; fagocitosi delle cellule apoptotiche
CD40	Omodimero di catene di 44-48 kD; superfamiglia dei recettori del TNF	Linfociti B, macrofagi, cellule dendritiche, cellule endoteliali	Lega CD154 (ligando del CD40); ruolo nell’attivazione dei linfociti B, dei macrofagi e delle cellule dendritiche indotta dai linfociti T
CD43	95-135 kD; sialomucina	Leucociti (eccetto i linfociti B circolanti)	? Ruolo nell’adesione cellula-cellula
CD44	80->100 kD, fortemente glicosilata	Leucociti, eritrociti	Lega l’acido ialuronico; coinvolta nell’adesione leucocitaria alle cellule endoteliali e alla matrice extracellulare
CD45 (Antigene leucocitario comune [LCA])	Molteplici isoforme, 180-220 kD (vedi CD45R); famiglia dei recettori della protein tirosin fosfatasi; famiglia della fibronectina di tipo III	Cellule ematopoietiche	Tirosin fosfatasi che regola l’attivazione dei linfociti T e B
CD45R	CD45RO:180 kD	CD45RO: linfociti	Vedi CD45

	CD45RA: 220 kD CD45RB: 190-, 205-, e isoforme 220-kD	T della memoria; sottotipo di linfociti B, monociti, macrofagi CD45RA: linfociti T naïve, linfociti B, monociti CD45RB: linfociti B, sottotipo di linfociti T	
CD46 (Proteina cofattore di membrana MCP)	52-58 kD; famiglia dei regolatori dell'attivazione del complemento	Leucociti, cellule epiteliali, fibroblasti	Regolazione dell'attivazione del complemento
CD47	47-52 kD; superfamiglia delle Ig	Tutte le cellule ematopoietiche, cellule epiteliali, cellule endoteliali, fibroblasti	Adesione, migrazione e attivazione leucitaria; segnale "non mangiarmi" per i fagociti
CD49d	150 kD; legato non covalentemente a CD29 per formare VLA-4 (integrina $\alpha_4\beta_1$)	Linfociti T, monociti, linfociti B, cellule NK, eosinofili, cellule dendritiche, timociti	Adesione leucocitaria all'endotelio e alla matrice extracellulare; si lega a VCAM-1 e MadCAM-1; lega la fibronectina e il collagene
CD54 (ICAM-1)	75-114 kD; superfamiglia delle Ig	Linfociti T, linfociti B, monociti, cellule endoteliali (inducibile dalle citochine)	Adesione cellula-cellula; ligando per CD11aCD18 (LFA-1) e CD11bCD18 (Mac-1); recettore per rhinovirus
CD55 (Fattore che accelera il decadimento [DAF])	55-70 kD; legato a GPI; famiglia dei regolatori dell'attivazione del complemento	Ampia	Regolazione dell'attivazione del complemento

CD58 (Antigene 3 associato alla funzione leucocitaria [LFA-3])	55-70 kD; proteina integrale di membrana o legata a GPI	Ampia	Adesione leucocitaria; lega CD2
CD59	18-20 kD; legato a GPI	Ampia	Lega C9; inibisce la formazione del complesso di attacco alla membrana
CD62E E-selectina)	115 kD; famiglia delle selectine	Cellule endoteliali	Adesione leucocita-endotelio
CD62L (L-selectina)	74-95 kD; famiglia delle selectine	linfociti B, linfociti T, monociti, granulociti, alcune cellule NK	Adesione leucocita-endotelio; migrazione dei linfociti T naïve verso i linfonodi periferici
CD62P (P-selectina)	140 kD; famiglia delle selectine	Piastrine, cellule endoteliali (presente in granuli, traslocata sulla superficie cellulare in seguito ad attivazione)	Adesione leucitaria all'endotelio e alle piastrine; lega CD162 (PSGL-1)
CD64 (FcγRI)	72 kD; superfamiglia delle Ig; associata con legame non-covalente alla catena comune γ degli FcR	Monociti, macrofagi, neutrofili attivati	Recettore Fcγ ad alta affinità; ruolo nella fagocitosi, nell'ADCC, nell'attivazione macrofagica
CD66e (Antigene carcino-embrionale [CEA])	180-220 kD; superfamiglia delle Ig; famiglia degli antigeni carcino-embrionali (CEA)	Cellule del colon e di altri epiteli	? Adesione; marcatore clinico della presenza di carcinoma
CD69	23 kD; lectina di	Linfociti B attivati,	Si lega e

	tipo C	linfociti T, cellule NK, neutrofili	diminuisce l’espressione superficiale di S1PR1, promuovendo in tal modo la ritenzione di linfociti di recente attivazione nei tessuti linfoidi
CD74 (Catena invariante dell’MHC di classe II [I_i])	33-, 35-, e isoforme 41-kD	Linfociti B, cellule dendritiche, monociti, macrofagi; altre cellule esprimenti MHC di classe II	Si lega alle molecole MHC di classe II di nuova sintesi e ne dirige il traffico intracellulare
CD79a (Igα)	33, 45 kD; forma un dimero con CD79b; superfamiglia delle Ig; ITAM nella coda citoplasmatica	Linfociti B maturi	Necessario per l’espressione sulla membrana e la trasduzione del segnale da parte del complesso recettoriale antigenico dei linfociti B
CD79b (Igβ)	37-39 kD; forma un dimero con CD79α; superfamiglia delle Ig; ITAM nella coda citoplasmatica	Linfociti B maturi	Necessario per l’espressione sulla membrana e la trasduzione del segnale da parte del complesso recettoriale antigenico dei linfociti B
CD80 (B7-1)	60 kD; superfamiglia delle Ig	Cellule dendritiche, linfociti B e macrofagi attivati	Costimolatore dell’attivazione dei linfociti T; ligando per CD28 e CD152 (CTLA-4)
CD81 (Bersaglio dell’antigene	26 kD; famiglia delle tetraspanine (TM4SF)	Linfociti T, Linfociti B, cellule NK, cellule	Attivazione dei linfociti B; forma un complesso

anti-proliferativo 1 [TAPA-1])		dendritiche, timociti, cellule endoteliali	corecettoriale con CD19 e CD21 che invia segnali che sinergizzano con segnali provenienti dal complesso recettoriale antigenico dei linfociti B
CD86 (B7-2)	80 kD; superfamiglia delle Ig	Linfociti B, monociti; cellule dendritiche; alcuni linfociti T	Costimolatore per l'attivazione dei linfociti T; ligando per CD28 e CD152 (CTLA-4)
CD88 (Recettore per C5a)	43 kD; famiglia dei recettori con 7 domini transmembrana accoppiati alle proteine G	Granulociti, monociti, cellule dendritiche, mastociti	Recettore per il frammento del complemento C5a; ruolo nell'infiammazione indotta dal complemento
CD89 (Recettore Fcα [FcαR])	55-75 kD; supefamiglia delle Ig; associato con legame non covalente con la catena comune FcR γ	Granulociti, monociti, macrofagi, sottotipo di linfociti T, sottotipo di linfociti B	Lega IgA; media la citotossicità cellulare dipendente da IgA
CD90 (Thy-1)	25-35 kD; legato a GPI; superfamiglia delle Ig	Timociti, linfociti T periferici (topo), cellule progenitrici ematopoietiche $CD34^+$, neuroni	Marcatore per linfociti T; funzione sconosciuta
CD94	43 kD; lectina di tipo C-; su cellule NK, si assembla con legame covalente con altre molecole di lectina di tipo C (NKG2)	Cellule NK; sottotipo di linfociti T $CD8^+$	Il complesso CD94/NKG2 funziona come un recettore inibitorio delle cellule NK; lega molecole MHC di classe I (HLA-E)

CD95 (Fas)	Omotrimero delle catene 45-kD; superfamiglia dei recettori del TNF	Broad	Lega il FasL; invia segnali che inducono morte per apoptosi
CD102 (ICAM-2)	55-65 kD; superfamiglia delle Ig	Cellule endoteliali, linfociti, monociti, piastrine	Ligando per CD11aCD18 (LFA-1); adesione cellula-cellula
CD103 (Subunità integrinica α_E)	Dimero di subunità di 150- e 25-kD; legata non covalentenetmente alla subunità integrinica β_7 per formare l'integrina $\alpha_E\beta_7$	Linfociti intraepiteliali, altri tipi cellulari	Ruolo nel reclutamento e ritenzione dei linfociti T nelle mucose; lega la caderina E
CD106 (Molecola di adesione cellulare vascolare 1 [VCAM-1])	100-110 kD; superfamiglia delle Ig	Cellule endoteliali, macrofagi, cellule dendritiche follicolari, cellule stromali midollari	Adesione delle cellule all'endotelio; recettore per l'integrina CD49dCD29 (VLA-4); ruolo nel traffico linfocitario, attivazione
CD134 (OX40, TNFRSF4)	29 kD; superfamiglia dei recettori del TNF	Linfociti T attivati	Recettore per CD252; costimolazione dei linfociti T
CD150 (Molecola di attivazione del signaling linfocitario [SLAM])	37 kD; superfamiglia delle Ig	Timociti, linfociti attivati, cellule dendritiche, cellule endoteliali	Regolazione delle interazioni linfocitiB-linfociti T e attivazione linfocitaria
CD152 (Proteina 4 associata ai linfociti T	33, 50 kD; superfamiglia delle Ig	Linfociti T attivati, linfociti T regolatori	Media la funzione soppressoria delle cellule T regolatorie;

citotossici [CTLA-4])			inibisce le risposte dei linfociti T; lega CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) sulle cellule presentanti l’antigene
CD154 (Ligando di CD40 [CD40L])	Omotrimero di catene di 32-39-kD; superfamiglia dei recettori del TNF	Linfociti T $CD4^+$ attivati	Attivazione dei linfociti B, macrofagi e cellule endoteliali; ligando per CD40
CD158 (Recettore killer del tipo Ig [KIR])	50, 58 kD; superfamiglia delle Ig; famiglia dei recettori killer di tipo Ig (KIR); domini ITIM o ITAM nella coda citoplasmatica	Cellule NK, sottotipo dei linfociti T	Inibizione o attivazione delle cellule NK in seguito all’interazione con le appropriate molecole HLA di classe I
CD159a (NKG2A)	43 kD; lectina di tipo C; forma un eterodimero con CD94	Cellule NK, sottotipo di linfociti T	Inibizione o attivazione delle cellule NK in seguito all’interazione con molecole HLA di classe I
CD159c (NKG2C)	40 kD; lectina di tipo C; forma un eterodimero con CD94	Cellule NK	Attivazione delle cellule NK in seguito all’interazione con le molecole HLA di classe I appropriate
CD162 (Ligando glicoproteico 1 della P selectina [PSGL-1])	Omodimero di catene di 120-kD; sialomucina	Linfociti T, monociti, granulociti, alcuni linfociti B	Ligando per le selectine (CD62P, CD62L); adesione dei leucociti all’endotelio
CD178 (Ligando di	Omotrimero di subunità di 31-kD;	Linfociti T attivati	Ligando per CD95 (Fas); induce morte

Fas [FasL])	superfamiglia dei recettori del TNF		per apoptosi
CD206 (Recettore del mannosio)	166 kD; lectina di tipo C	Macrofagi	Lega glicoproteine contenenti elevate quantità di mannosio presenti sui patogeni; media l'endocitosi delle glicoproteine da parte dei macrofagi e la fagocitosi dei batteri, funghi e altri patogeni
CD244 (2B4)	41 kD; superfamiglia delle Ig; famiglia di CD2/CD48/CD58; famiglia di SLAM	Cellule NK, linfociti T CD8, cellule T γδ	Recettore per CD148; modula l'attività citolitica delle cellule NK
CD247 (Catena ζ del TCR)	18 kD; ITAMs nella coda citoplasmatica	Linfociti T; cellule NK	Subunità coinvolta nella trasduzione del segnale del TCR e dei recettori attivatori delle cellule NK
CD252 (Ligando di OX40)	21 kD; superfamiglia di recettori del TNF	Cellule dendritiche, macrofagi, linfociti B	Ligando di CD134 (OX40, TNFRSF4); costimola i linfociti T
CD267 (TACI)	31 kD; superfamiglia dei recettori del TNF	Linfociti B	Recettore delle citochine BAFF e APRIL; media la sopravvivenza dei linfociti B
CD268 (Recettore di BAFF)	19 kD; superfamiglia dei recettori del TNF	Linfociti B	Recettore per BAFF; media la sopravvivenza dei linfociti B
CD269 (BCMA	20 kD; superfamiglia dei	Linfociti B	Recettore per BAFF e APRIL;

[antigene di maturazione dei linfociti B])	recettori del TNF		media la sopravvivenza dei linfociti B
CD273 (PD-L2)	25 kD; superfamiglia delle Ig; strutturalmente omologo a B7	Cellule dendritiche, monociti, macrofagi	Ligando di PD-1; inibisce l'attivazione dei linfociti T
CD274 (PD-L1)	33 kD; superfamiglia delle Ig; strutturalmente omologo a B7	Leucociti, altre cellule	Ligando di PD-1; inibisce l'attivazione dei linfociti T
CD275 (Ligando di ICOS)	60 kD; superfamiglia delle Ig; strutturalmente omologo a B7	Linfociti B, cellule dendritiche, monociti	Lega ICOS (CD278); costimolazione dei linfociti T
CD278 (ICOS [costimolatore inducibile])	55-60 kD; superfamiglia delle Ig; strutturalmente omologo a CD28	Linfociti T attivati	Lega ICOS-L (CD275); costimolazione dei linfociti T
CD279 (PD1)	55 kD; superfamiglia delle Ig; strutturalmente omologo a CD28	Linfociti T e B attivati	Lega PD-L1 e PD-L2; inibisce l'attivazione dei linfociti T
CD314 (NKG2D)	42 kD; lectina di tipo C	Cellule NK, linfociti T $CD8^+$ attivati, linfociti NKT, alcune cellule mieloidi	Lega MHC di classe I, e le molecole tipo classe I MIC-A, MIC-B, Rae1, e ULBP4; ruolo nell'attivazione delle cellule NK e CTL
CD357 (GITR)	26 kD; superfamiglia dei recettori del TNF	Linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$ T, Treg	? Ruolo nella tolleranza dei

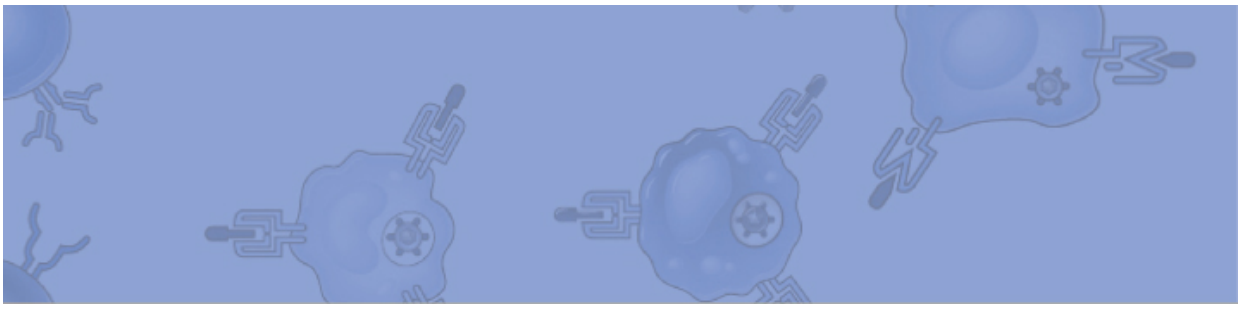
			linfociti T e nella funzione delle Treg
CD363 (S1PR1 [recettore di tipo 1 della sfingosina-1-fosfato])	42.8 kD; famiglia dei recettori a 7 domini transmembrana accoppiati alle proteine G	Linfociti, cellule endoteliali	Lega la sfingosina-1- fosfato e media l'uscita dei linfociti dagli organi linfoidi

ADCC (*Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity*), citotossicità anticorpo-dipendente cellulo-mediata; APRIL (*A Proliferation-Inducing Ligand*), ligando che induce proliferazione; BAFF (*B cell Activating Factor belonging to the TNF Family*), fattore di attivazione di linfociti B appartenente alla famiglia del TNF; CTL (*Cytotoxic T Lymphocyte*), linfocita T citotossico; gp, glicoproteine; GPI (*GlycoPhosphatIdylinositol*), glicofosfatidilinositolo; ICAM (*InterCellular Adhesion Molecule*), molecola di adesione intracellulare; Ig, immunoglobulina; IL, interleuchina; ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*), sequenza di attivazione caratterizzata da tirosine degli immunorecettori; ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*), sequenza di inibizione caratterizzata da tirosine degli immunorecettori; KIR (*Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor*), recettore killer inibitorio; LFA (*Lymphocyte Function-Associated Antigen*), antigene linfocitario funzione-associato; LPS, lipopolisaccaride; MadCAM (*Mucosal addressin Cell Adhesion Molecule*), addressina mucosale, molecola di adesione cellulare; MHC (*Major Histocompatibility Complex*), complesso maggiore d'istocompatibilità; NAIL, Natural killer Cell-Activating Ligand; NK, cellule natural killer; PADGEM (*Platelet Activation-Dependent Granule-External Membrane protein*), proteina piastrinica traslocata dai granuli alla membrana esterna dipendente dall'attivazione; PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*), profili molecolari associati ai patogeni; PECAM (*Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*), molecola di adesione piastrine-endotelio; PSGL-1, P-selectin glycoprotein ligand 1; TACI (*Transmembrane Activator and CAML Interactor*), attivatore transmembrana e interagente con CAML; TCR (*T Cell Receptor*), recettore del linfocita T; TLR (*Toll-Like Receptor*), recettore Toll-like; TNF (*Tumor Necrosis Factor*), fattore di necrosi tumorale; TNFR (*TNF Receptor*), recettore del fattore di necrosi tumorale; VCAM (*Vascular Cell Adhesion Molecule*), molecola di adesione delle cellule vascolari; VLA (*Very Late Antigen*), antigene molto tardivo.

* Le lettere minuscole aggiunte ad alcune sigle CD si riferiscono a molecole complesse codificate da diversi geni o appartenenti a famiglie di proteine strutturalmente correlate. Per esempio, CD1a, CD1b, CD1c e CD1d sono strutturalmente correlate, ma rappresentano forme diverse di una proteina non polimorfa associata alla b2-microglobulina.

Appendice

IV



TECNICHE DI LABORATORIO DI USO COMUNE IN IMMUNOLOGIA

TECNICHE CHE SI BASANO SULL'UTILIZZO DEGLI ANTICORPI

- Quantificazione dell'antigene mediante immunoassay
- Identificazione e purificazione delle proteine
- Immunoprecipitazione e cromatografia per affinità
- Western blot
- Marcatura e rilevazione degli antigeni nelle cellule o nei tessuti
- Citometria a flusso e separazione cellulare attivata dalla fluorescenza
- Purificazione di popolazioni cellulari
- Immunofluorescenza e immunoistochimica
- Valutazione dell'interazione antigene-anticorpo

TOPI TRANSGENICI E TOPI KNOCKOUT

METODI PER LO STUDIO DELLE RISPOSTE DEI LINFOCITI T

- Attivazione policlonale dei linfociti T
- Attivazione mediante antigene di popolazioni policlonali di linfociti T
- Attivazione indotta dall'antigene di linfociti T specifici
- Metodi per enumerare e studiare funzionalmente la risposta T

METODI PER LO STUDIO DELLE RISPOSTE DEI LINFOCITI B

- Attivazione policlonale delle cellule B
- Attivazione indotta dall'antigene dei linfociti B specifici
- Analisi della proliferazione dei linfociti B e della produzione anticorpale

Molte delle tecniche di laboratorio usate di routine nella ricerca e nella pratica clinica si basano sull'utilizzo degli anticorpi. Inoltre, molte tecniche della moderna biologia molecolare hanno fornito preziose informazioni sul sistema immunitario. Abbiamo spesso menzionato queste tecniche nello svolgimento di tutto il volume e in questa appendice, descriveremo i principi che sono alla base di alcuni tra i principali metodi di laboratorio di comune utilizzo in immunologia. Maggiori dettagli sperimentali possono essere reperiti su specifici manuali di laboratorio.

TECNICHE CHE SI BASANO SULL'UTILIZZO DEGLI ANTICORPI

Data la loro elevata specificità, gli anticorpi costituiscono utili reagenti per determinare, purificare e misurare gli antigeni. Dal momento che gli anticorpi possono essere virtualmente prodotti contro ogni tipo di macromolecola e composto chimico, le tecniche basate sull'utilizzo degli anticorpi sono potenzialmente impiegate per studiare ogni tipo di molecola in soluzione o localizzata all'interno di una cellula. Le nuove tecnologie per la produzione degli anticorpi monoclonali (vedi Cap. 5) hanno notevolmente facilitato la possibilità di produrre anticorpi con la specificità desiderata. In passato, molte delle tecniche basate sull'impiego degli anticorpi si fondavano sulla loro capacità di legare antigeni specifici formando voluminosi immunocomplessi, in soluzione o in gel, che venivano poi individuati con vari metodi ottici. Queste metodiche, di grande importanza nei primi studi, attualmente sono state quasi completamente soppiantate da tecniche più semplici, basate sull'impiego di anticorpi o antigeni immobilizzati, legati cioè a supporti fissi.

Quantificazione dell'antigene mediante immunoassay

Le metodiche immunologiche di quantificazione delle concentrazioni dell'antigene offrono sensibilità e specificità eccellenti e sono diventate tecniche standard per le applicazioni cliniche e di ricerca. Tutti i moderni metodi immunochimici di misurazione si basano sull'utilizzo di un antigene o di un anticorpo purificato, le cui quantità possono essere misurate da un indicatore (o da un colorante). Quando l'antigene o l'anticorpo è marcato con un radioisotopo, come descritto per la prima volta da Rosalyn Yalow, può essere misurato con strumenti che rilevano la radioattività. In questo caso il dosaggio è detto **radioimmunologico** (*RadioImmunoAssay*, **RIA**). Quando l'antigene o l'anticorpo è legato in maniera covalente a un enzima, esso può essere misurato determinando con uno spettrofotometro la velocità con cui l'enzima converte un substrato incolore in un prodotto colorato; in questo caso si parla di **dosaggio di adsorbimento immunoenzimatico** (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, **ELISA**). Esistono numerose

variazioni dei dosaggi RIA o ELISA, ma la versione più comunemente usata è il test “a sandwich” (Fig. A-1), il quale utilizza due differenti anticorpi che riconoscono differenti epitopi dell’antigene di cui si deve determinare la concentrazione. Una quantità fissa di un anticorpo è legata a un supporto solido, come le pareti di plastica dei micropozzetti. Le soluzioni da testare che contengono l’antigene a concentrazione sconosciuta o una serie di soluzioni standard con concentrazioni note di antigene vengono aggiunte ai pozzetti in modo da permetterne il legame con l’anticorpo. L’antigene non legato viene rimosso mediante lavaggio, quindi viene aggiunto il secondo anticorpo, coniugato con un enzima o radiomarcato, in modo che questo possa legarsi all’antigene immobilizzato sulla plastica. L’antigene funge da ponte, così che maggiore è la quantità di antigene presente nel campione e nelle soluzioni standard, maggiore sarà la quantità del secondo anticorpo coniugato con l’enzima, o radiomarcato, che si lega all’antigene. I risultati ottenuti con soluzioni standard, contenenti quantità note di antigene, vengono usati per costruire una curva di legame per il secondo anticorpo in funzione della concentrazione dell’antigene; da questa potrà essere dedotta la quantità di antigene presente nelle soluzioni testate. Se questo test viene eseguito con due anticorpi monoclonali, è essenziale che gli anticorpi siano diretti contro determinanti non sovrapposti dell’antigene, in modo che il primo anticorpo non impedisca il legame del secondo.

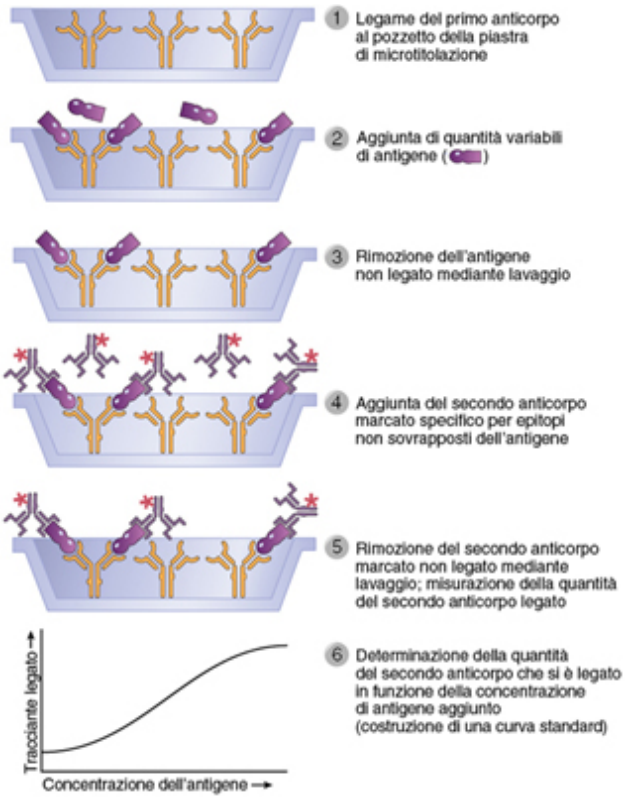


FIGURA A-1 Metodo di adsorbimento immunoenzimatico o radioimmunologico a sandwich. Una quantità fissa di un anticorpo viene immobilizzata e utilizzata per catturare un antigene. Il legame di un secondo anticorpo marcato che riconosce un epitopo non sovrapposto sull'antigene aumenterà proporzionalmente alla concentrazione dell'antigene e permetterà la sua quantificazione.

In un'importante variante clinica di questo test, i campioni dei pazienti possono essere testati per la presenza di anticorpi specifici per un antigene microbico (per esempio anticorpi che reagiscono con le proteine del virus dell'immunodeficienza umana [HIV] o del virus dell'epatite B) come marcatori dell'infezione. In questo caso, viene aggiunta una quantità saturante di antigene ai pozzetti che contengono l'anticorpo legato alla piastra oppure l'antigene viene attaccato direttamente alla piastra e si lasciano reagire le diluizioni seriate del siero del paziente. La quantità dell'anticorpo del paziente legato all'antigene immobilizzato viene valutata con l'uso di un secondo anticorpo anti-Ig umane, coniugato con un enzima o radiomarcato.

Identificazione e purificazione delle proteine

Gli anticorpi possono essere usati per identificare e caratterizzare le proteine e per purificare le proteine specifiche da soluzioni complesse. I due metodi più comunemente utilizzati a questo scopo sono l'immunoprecipitazione e la cromatografia per affinità. Il Western blot è una tecnica molto usata per determinare la presenza di una proteina in un campione biologico e per stabilirne il suo peso molecolare.

Immunoprecipitazione e cromatografia per affinità

L'immunoprecipitazione è una tecnica in cui un anticorpo specifico per un antigene proteico viene usato per isolare l'antigene da una miscela di proteine (Fig. A-2, *A*). Generalmente l'anticorpo viene aggiunto alla soluzione di proteine (di solito cellule lisate con un detergente), quindi vengono aggiunte biglie di agarosio a cui è covalentemente legata la proteina A (o la proteina G) dello stafilococco. Le porzioni Fab dell'anticorpo si legano alla proteina bersaglio, mentre la porzione Fc viene captata dalla proteina A o dalla proteina G legate alle biglie di agarosio. Le altre proteine che non vengono riconosciute dall'anticorpo sono eliminate con il lavaggio delle biglie (attraverso ripetute aggiunte di detergente e centrifugazioni). La proteina che è riconosciuta e legata all'anticorpo può essere ora eluita dalle biglie e dissociata dall'anticorpo con l'uso di un agente denaturante aggressivo (come il sodio dodecilsolfato) e purificata attraverso un gel di sodio dodecilsolfato-poliacrilamide (*Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE). Le proteine possono essere visualizzate dopo l'elettroforesi attraverso la colorazione del gel di poliacrilamide o tramite Western blot (descritto in seguito). Se la soluzione eterogenea iniziale conteneva proteine marcate radioattivamente, le proteine specifiche immunoprecipitate possone essere visualizzate mediante l'autofluorografia o l'autoradiografia; in questo modo le bande proteiche vengono impresse su una lastra a raggi X posizionata sul gel di SDS-poliacrilamide contenente le proteine ed essiccato.

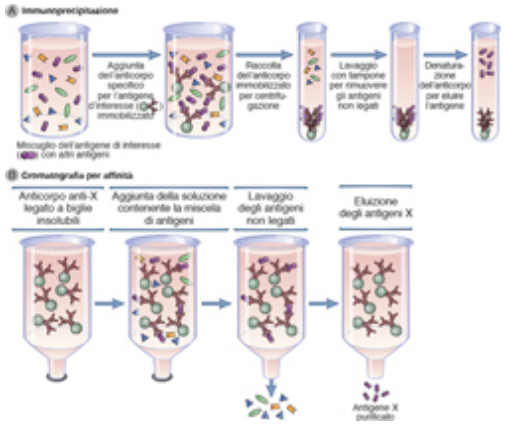


FIGURA A-2 Isolamento di un antigene mediante immunoprecipitazione o cromatografia per affinità. A. Un particolare antigene può essere purificato dal siero o da altre soluzioni aggiungendo anticorpi specifici per l'antigene legati a biglie insolubili. L'antigene non legato viene eliminato e l'antigene desiderato viene distaccato dalle Ig tramite variazioni del pH o della forza ionica in modo da ridurre l'affinità del legame antigene-anticorpo. L'immunoprecipitazione può essere usata come mezzo di purificazione, di misurazione o di identificazione di un antigene. Gli antigeni purificati per immunoprecipitazione vengono spesso analizzati mediante elettroforesi su gel di SDS-poliacrilamide. **B.** La cromatografia per affinità si basa sullo stesso principio dell'immunoprecipitazione tranne per il fatto che l'anticorpo è in genere legato a una matrice insolubile o a un gel in una colonna. Il metodo è spesso utilizzato per isolare antigeni solubili (mostrato in figura) o anticorpi specifici per l'antigene immobilizzato.

La cromatografia per immunoaffinità, una variante della cromatografia per affinità, è una tecnica di purificazione basata su anticorpi adesi a un supporto insolubile per rimuovere e quindi purificare gli antigeni da una soluzione (vedi Fig. A-2, *B*). Gli anticorpi specifici per l'antigene desiderato sono di solito legati in modo covalente a un supporto compatto, come biglie di agarosio stipate in una colonna, uniti direttamente o indirettamente, come descritto per l'immunoprecipitazione. La miscela contenente antigeni diversi viene fatta passare attraverso le biglie per permettere all'antigene riconosciuto dall'anticorpo di legarsi. Le molecole non legate vengono rimosse mediante lavaggio e l'antigene legato viene eluito variando il pH o per esposizione a soluzioni altamente saline o altri agenti caotropici che spezzano l'interazione antigene-anticorpo. Un metodo simile può essere usato per purificare gli anticorpi da supernatanti di colture cellulari o da fluidi naturali, come il siero, prima coniugando l'antigene alle biglie e poi facendo passare attraverso la colonna il materiale da sottoporre a purificazione.

Western blot

Il Western blot (Fig. A-3) viene usato per determinare le quantità relative e il peso molecolare di una proteina all'interno di una miscela di proteine o di altre molecole. La miscela viene prima sottoposta a separazione analitica, in genere con SDS-PAGE, per separare le diverse proteine in funzione del loro peso molecolare. Le proteine separate vengono successivamente trasferite per capillarità (blotting) o per elettroforesi dal gel di poliacrilamide a una membrana di supporto in modo tale che la membrana costituisca una replica delle macromolecole presenti nel gel. Durante il processo di trasferimento l'SDS viene allontanato dalle proteine che riprendono la propria conformazione terziaria riacquisendo i determinanti antigenici nativi. La posizione degli antigeni proteici sulla membrana può essere individuata mediante il legame di un anticorpo non-marcato, specifico per quella proteina (anticorpo primario), seguito da una seconda marcatura con un anticorpo che riconosce l'anticorpo primario. Questo approccio fornisce informazioni sulla quantità e il peso molecolare dell'antigene. Generalmente l'anticorpo secondario è coniugato con enzimi che generano chemiluminescenza e impressionano una lastra fotografica. Per marcare l'anticorpo possono essere usati anche fluorofori che emettono nell'infrarosso vicino: la luce emessa dall'eccitazione del fluoroforo fornisce una più accurata quantificazione dell'antigene rispetto ad anticorpi secondari legati a un enzima. La sensibilità e la specificità di questa tecnica possono essere amplificate partendo da proteine immunoprecipitate piuttosto che da una miscela di proteine grezze. Questa procedura sequenziale è utile soprattutto per rilevare le interazioni proteina-proteina. Per esempio, l'associazione fisica di due differenti proteine nella membrana di un linfocita può essere definita immunoprecipitando un estratto di membrane cellulari tramite un anticorpo specifico per una delle proteine e analizzando tramite Western blot l'immunoprecipitato, usando un secondo anticorpo specifico per la seconda proteina che è stata coimmunoprecipitata.

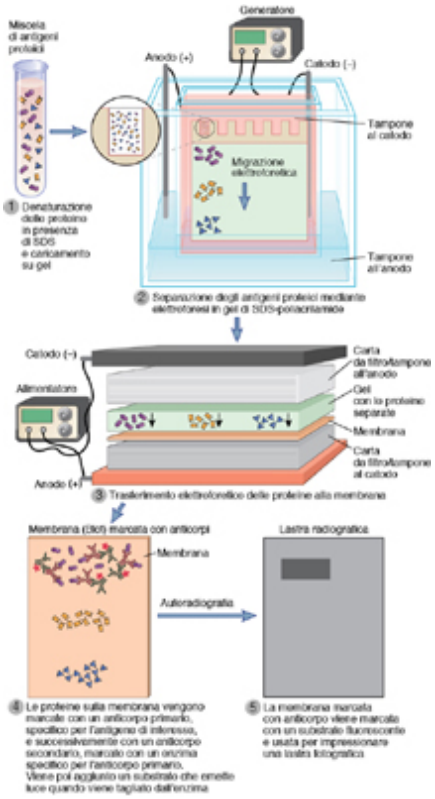


FIGURA A-3 Caratterizzazione dell'antigene mediante Western blot. Gli antigeni proteici, separati mediante elettroforesi su gel di SDS-poliacrilamide e trasferiti su una membrana, possono essere marcati con un anticorpo che a sua volta viene visualizzato con un secondo anticorpo, che può essere coniugato a un enzima, come la horse-radish perossidasi, o a un fluoroforo.

La tecnica di trasferimento delle proteine da un gel a una membrana è detta Western blot per un gioco di parole del ricercatore che l'ha messa a punto. "Southern" è infatti il nome dello scienziato che per primo aveva blottato su una membrana il DNA separato mediante un gel, una tecnica da allora chiamata Southern blot. Per analogia, la tecnica di trasferimento dell'RNA da un gel a una membrana è stata denominata *Northern blot*, e "Western blot" è il termine usato per indicare il trasferimento delle proteine su una membrana.

Marcatura e rilevazione degli antigeni nelle cellule o nei tessuti

Gli anticorpi vengono comunemente utilizzati per identificare gli antigeni di membrana o intracellulari nei tessuti e nelle sospensioni cellulari e per separare specifiche cellule da una popolazione mista. Per queste tecniche, gli anticorpi possono essere radiomarcati, coniugati a enzimi o, più spesso,

marcati con un fluorocromo in modo che possano essere utilizzati appropriati sistemi di rilevazione che consentano di identificare l'anticorpo marcato. In alcuni casi vengono impiegati anticorpi coniugati a biglie magnetiche per isolare fisicamente le cellule che esprimono gli antigeni specifici.

Citometria a flusso e separazione cellulare attivata dalla fluorescenza

Lo stipite differenziativo, lo stadio di maturazione o lo stato di attivazione di una cellula possono essere valutati analizzando l'espressione in membrana o intracellulare di molecole specifiche. Questa tecnica viene generalmente eseguita marcando la cellula con sonde fluorescenti, specifiche per queste molecole, e misurando la quantità di fluorescenza emessa dalla cellula stessa (Fig. A-4). Il citometro a flusso è un particolare strumento che può rilevare la fluorescenza emessa da una singola cellula in sospensione e quindi determinare il numero delle cellule che esprimono la molecola a cui la sonda fluorescente si lega. Le sospensioni di cellule vengono incubate con sonde fluorescenti e la quantità di sonda legata viene misurata facendo passare una alla volta le cellule in un raggio laser. È possibile paragonare la quantità relativa di una determinata molecola in diverse popolazioni cellulari colorando ogni popolazione con la stessa sonda e determinando la quantità della fluorescenza emessa. Nella preparazione per l'analisi in citometria a flusso, le sospensioni cellulari vengono marcate con sonde fluorescenti; generalmente, queste sonde sono costituite da anticorpi specifici marcati con fluorocromi. In alternativa, è possibile rilevare l'espressione anche di molecole citoplasmatiche permeabilizzando temporaneamente le cellule e permettendo all'anticorpo marcato di penetrare attraverso la membrana plasmatica. Inoltre, possono essere rilevati tramite la citometria a flusso vari indicatori fluorescenti in grado di determinare le concentrazioni di ioni citoplasmatici e il potenziale ossidoriduttivo. Con la citometria a flusso è possibile effettuare lo studio del ciclo cellulare utilizzando sonde fluorescenti che legano il DNA, come lo ioduro di propridio. I moderni citofluorimetri possono rilevare routinariamente tre o più segnali fluorescenti di diverso colore, ciascuno legato a un diverso anticorpo o a una diversa sonda. Questa tecnica permette l'analisi simultanea dell'espressione di combinazioni diverse di molecole da parte di una cellula. Oltre a rilevare un

segnale fluorescente, i citofluorimetri misurano anche la proprietà della cellula di disperdere la luce anteriormente (*forward scatter*) e lateralmente (*side scatter*), parametri che riflettono rispettivamente le dimensioni e la relativa struttura (complessità) interna della cellula. Queste informazioni vengono spesso utilizzate per distinguere i differenti tipi cellulari. Per esempio, i linfociti, rispetto ai neutrofili, determinano una maggiore dispersione laterale, a causa dei loro granuli citoplasmatici, e i monociti una maggiore dispersione anteriore, a causa della loro dimensione.

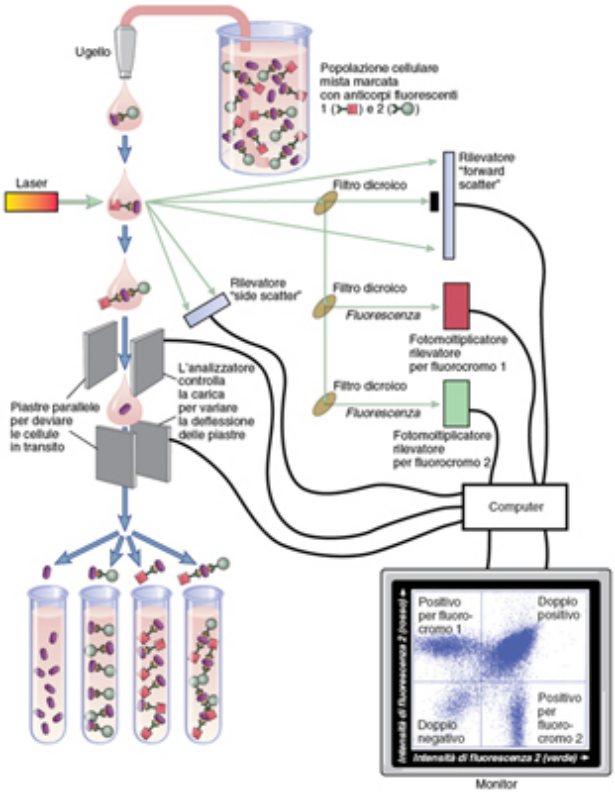


FIGURA A-4 Principio della citometria a flusso e della separazione cellulare in base al segnale di fluorescenza. Il fascio laser incidente è di una lunghezza d'onda prescelta e la luce che emerge dal campione viene analizzata per la sua dispersione anteriore (*forward scatter*) e laterale (*side scatter*) e per la fluorescenza su due o più lunghezze d'onda, in base al fluorocromo legato agli anticorpi. La separazione qui mostrata si basa su due marcatori (*sorting* a due colori). I moderni strumenti possono analizzare e separare di routine popolazioni cellulari sulla base di tre o più diverse sonde colorate.

È stata recentemente sviluppata una nuova tecnologia, sempre basata sull'utilizzo di anticorpi, denominata citometria di massa che combina la tecnologia del flusso a singola cellula, dei citometri a flusso, con la spettrometria di massa. Lo strumento disponibile in commercio utilizzato a

questo scopo è si chiama **CyTOF**, dove l'acronimo "TOF" indica che si tratta di un citometro a massa "a tempo di volo" (*Time Of Flight*, TOF). Gli anticorpi specifici per le molecole in esame sono marcati con uno qualsiasi dei numerosi metalli pesanti, utilizzando un metallo differente per ogni anticorpo usato.

Questi anticorpi vengono quindi utilizzati per marcare le popolazioni cellulari di interesse successivamente prima di essere analizzate dallo strumento **CyTOF** per effettuare spettrometria di massa sulla singola cellula.

Al contrario dei fluorocromi, molti dei metalli pesanti utilizzati come indicatori possono essere riconononosciuti in modo specifico dalla spettrometria di massa senza sovrapposizione, consentendo l'analisi simultanea di molecole differenti (fino a 100) su una singola cellula.

Purificazione di popolazioni cellulari

Il separatore (*sorter*) di cellule attivato dalla fluorescenza (*Fluorescent-Activated Cell Sorter*, FACS) è un adattamento del citofluorimetro che permette di separare le popolazioni cellulari in base al tipo e alla quantità di sonda fluorescente che esse legano. Questa tecnica si effettua deviando in modo differenziale le cellule con campi elettromagnetici, la cui forza e la cui direzione vengono variate a seconda dell'intensità del segnale di fluorescenza (vedi Fig. A-4). Le cellule possono essere marcate con anticorpi fluorescenti *ex vivo* oppure, nel caso di studi con animali da esperimento, la marcatura può essere ottenuta *in vivo* attraverso l'espressione di transgeni che codificano per proteine fluorescenti come la proteina fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*, GFP). (La tecnologia transgenica è descritta più avanti in questa Appendice.)

Un'altra tecnica utilizzata comunemente per purificare le cellule con un particolare fenotipo è quella degli anticorpi legati a biglie magnetiche. Questi "reagenti immunomagnetici" si legano alle cellule, in relazione alla specificità degli anticorpi usati, e le cellule legate possono essere recuperate dalla sospensione mediante l'utilizzo di un potente magnete.

Immunofluorescenza e immunoistochimica

Gli anticorpi possono essere usati per identificare la distribuzione anatomica di un antigene in un tessuto o all'interno di compartimenti cellulari. Per

farlo, il tessuto o la cellula vengono incubati con un anticorpo marcato con un fluorocromo o un enzima; la posizione del marcatore, determinata con un microscopio idoneo, viene usata per desumere la distribuzione dell'antigene. Nella prima versione di questo metodo, detta immunofluorescenza, l'anticorpo era marcato con un colorante fluorescente e veniva fatto reagire con un monostrato di cellule o una sezione di tessuto congelato. Le cellule o i tessuti colorati venivano poi esaminati con un microscopio a fluorescenza per localizzare l'anticorpo. Nonostante la buona sensibilità, il microscopio a fluorescenza non è lo strumento ideale per identificare i dettagli delle strutture della cellula o del tessuto a causa di un basso rapporto segnale/rumore. Questo problema è stato superato da nuove tecnologie, tra cui il microscopio confocale, il quale utilizza filtri ottici per eliminare la luce fluorescente che è fuori dal piano di fuoco, e il microscopio a due fotoni, che previene la formazione di segnali non a fuoco. In alternativa, gli anticorpi possono essere associati a enzimi che convertono substrati incolori in sostanze insolubili colorate, che precipitano nella posizione dell'enzima. Un microscopio ottico tradizionale può quindi essere utilizzato per localizzare l'anticorpo nelle cellule o nei tessuti colorati. La variante più comune di questo metodo utilizza come enzima la perossidasi del rafano e la tecnica è comunemente indicata con il nome di immunoperossidasi. Un altro enzima comunemente utilizzato è la fosfatasi alcalina. Per ottenere la simultanea colocalizzazione dei differenti antigeni possono essere utilizzati anticorpi diversi coniugati a differenti enzimi. In altre varianti, gli anticorpi possono essere coniugati a sonde elettrondense, come l'oro colloidale, e la localizzazione degli anticorpi può essere determinata a livello subcellulare con il microscopio elettronico, mediante una tecnica detta immunoelettromicroscopia. Particelle d'oro di diversa dimensione vengono utilizzate per la localizzazione simultanea di differenti antigeni a livello ultrastrutturale.

In tutte le metodiche di immunomicroscopia, i segnali possono essere amplificati dall'uso di tecniche "a sandwich". Per esempio, invece di coniugare la perossidasi a un anticorpo monoclonale murino diretto contro l'antigene di interesse, si può coniugare l'enzima a un secondo anticorpo, un antianticorpo (per esempio un anticorpo di coniglio anti-Ig murino) che si lega al primo anticorpo non marcato. Quando il marcatore viene coniugato direttamente all'anticorpo primario specifico, il metodo è detto diretto;

quando il marcatore è coniugato a un anticorpo secondario o addirittura terziario, il metodo è detto indiretto. In alcuni casi, si possono utilizzare metodi indiretti basati su molecole diverse dall'anticorpo. Per esempio, possono essere coniugate a fluorocromi o a enzimi la proteina stafilococcica A, che si lega alle IgG, oppure l'avidina, che si lega a un anticorpo primario marcato con biotina.

Valutazione dell'interazione antigene-anticorpo

In molte situazioni, è importante conoscere l'affinità di un anticorpo per un antigene. Per esempio, l'utilità di un anticorpo monoclonale come reagente sperimentale o terapeutico dipende dalla sua affinità. Nel caso di antigeni a basso peso molecolare, l'affinità dell'anticorpo per l'antigene può essere misurata direttamente (per esempio nel caso degli apteni) utilizzando un metodo detto dialisi all'equilibrio (Fig. A-5). In questo metodo, una soluzione di anticorpi viene racchiusa all'interno di una membrana porosa di cellulosa "semipermeabile" e immersa in una soluzione che contiene l'antigene. (*Semipermeabile* in questo contesto significa che le molecole di piccole dimensioni, come l'antigene, possono attraversare liberamente i pori della membrana, mentre le macromolecole, come l'anticorpo, non possono.) Se non è presente alcun anticorpo all'interno della membrana semipermeabile, l'antigene in soluzione diffonde attraverso la membrana fino a raggiungere la concentrazione identica presente nella soluzione esterna. In altre parole, l'antigene diffonde attraverso la membrana semipermeabile fino a quando viene raggiunto un equilibrio dinamico. Quando all'interno della membrana è presente l'anticorpo, la quantità di antigene all'interno della membrana è tuttavia superiore rispetto a quella presente nel compartimento esterno. Questo fenomeno avviene perché solo la quota di antigene non legato può diffondere attraverso la membrana. Una volta raggiunto l'equilibrio, la concentrazione di antigene non legato è identica dentro e fuori la membrana. L'entità dell'incremento dell'antigene all'interno della membrana è funzione della concentrazione dell'antigene, della concentrazione dell'anticorpo e della costante di dissociazione (K_d) del legame antigene-anticorpo. Misurando le concentrazioni di antigene e di anticorpo, con la spettroscopia o con altri mezzi, si può calcolare la K_d.

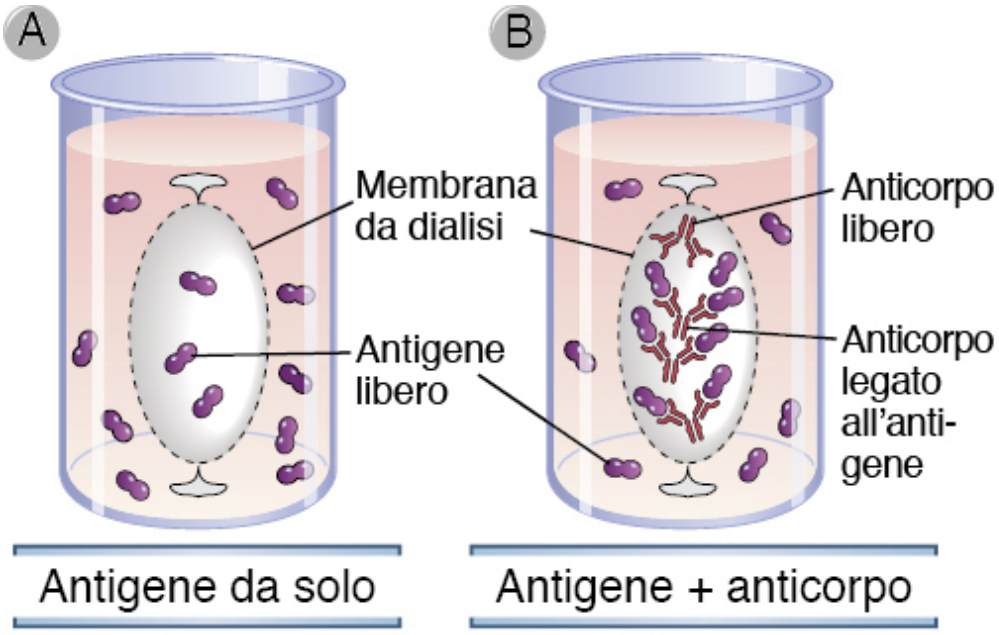


FIGURA A-5 Analisi del legame antigene-anticorpo mediante dialisi all'equilibrio. In presenza di anticorpi (**B**), la quantità dell'antigene all'interno di una membrana da dialisi è maggiore rispetto a quando l'anticorpo è assente (**A**). Come descritto nel testo, questa differenza, determinata dal legame dell'anticorpo con l'antigene, può essere utilizzata per misurare l'affinità dell'anticorpo per l'antigene. Questo esperimento può essere eseguito solo quando l'antigene è una molecola di piccole dimensioni (per esempio un aptene) in grado di attraversare liberamente la membrana da dialisi.

Una metodica alternativa per determinare la K_d è quella di misurare il tasso di associazione e di dissociazione dei complessi antigene-anticorpo. Queste variabili dipendono sia dalle concentrazioni di anticorpo e di antigene, sia dall'affinità dell'interazione. Tutti i parametri, tranne le concentrazioni, possono essere riassunti come costanti di velocità; sia la costante di associazione (K_{on}) sia la costante di dissociazione (K_{off}) possono essere calcolate sperimentalmente per determinare le concentrazioni e le reali velocità di associazione o di dissociazione. Il rapporto K_{off}/K_{on} permette di annullare tutti i parametri non correlati all'affinità ed è uguale alla costante di dissociazione K_d. Così, si può misurare la K_d mediante una dialisi all'equilibrio o calcolarla dalle costanti di velocità misurate in condizioni di non equilibrio.

Un altro metodo, oggi più comunemente usato, per misurare la cinetica dell'interazione tra antigene e anticorpo è la risonanza plasmonica di superficie. Con questa metodica un biosensore apposito, come il Biacore (*Biomolecular Interaction Analysis*) utilizza un approccio ottico per misurare

l’affinità di un anticorpo che viene fatto passare sopra un antigene immobilizzato su una superficie metallica. Una sorgente luminosa è messa a fuoco su questa superficie attraverso un prisma, orientato posto con un’angolatura specifica (risonanza), e la luce riflessa serve a misurare la risonanza plasmonica di superficie. L’interazione di un anticorpo con l’antigene altera la risonanza plasmonica di superficie e questa alterazione fornisce informazioni sull’affinità.

TOPI TRANSGENICI E TOPI KNOCKOUT

Per studiare *in vivo* gli effetti funzionali dei prodotti di geni specifici vengono utilizzati tre metodi importanti e correlati tra loro: 1) la creazione di topi transgenici convenzionali che esprimono in modo ectopico un particolare gene in un determinato tessuto; 2) la creazione di topi knockout, in cui la rimozione mirata di un particolare gene viene utilizzata per abolire la sua funzione; 3) la generazione di topi knockin, in cui un gene viene sostituito da una versione modificata dello stesso gene. L’approccio knockin prevede la sostituzione del gene originario con una versione mutata oppure, in teoria, permette di correggere una mutazione esistente nel gene originario con una versione “normale” del gene. Le tecniche che utilizzano topi geneticamente modificati sono state molto utilizzate per analizzare fenomeni biologici, come la maturazione, l’attivazione e la tolleranza dei linfociti.

Per generare topi transgenici convenzionali, vengono introdotte nel pronucleo di ovociti murini fecondati sequenze di DNA estraneo, dette transgeni, e gli ovociti vengono poi impiantati nelle tube di femmine pseudogravide. In genere, se vengono inoculate nel pronucleo alcune centinaia di copie del transgene, circa il 25% dei topi che nascono sarà transgenico. Un numero di copie variabili tra 1 e 50 si inserisce in serie in siti di rottura casuale dei cromosomi e viene successivamente ereditato come un tratto semplice mendeliano. L’integrazione avviene in genere prima della replicazione del DNA e per questo motivo la maggior parte (circa il 75%) dei neonati transgenici presenta il transgene in tutte le cellule, comprese quelle della linea germinativa. Nella maggior parte dei casi, l’integrazione del DNA estraneo non altera la funzione del gene endogeno. Altresì, ogni

topo che reca il transgene è eterozigote e mediante opportuni incroci possono essere generate linee omozigoti.

La grande importanza della tecnologia transgenica risiede nel fatto che può essere usata per esprimere geni a livello di particolari tessuti mediante l'associazione alle sequenze codificanti di sequenze regolatrici che normalmente governano l'espressione selettiva dei geni in un dato tessuto. Per esempio, promotori ed enhancer linfoidi possono essere usati per esprimere i geni nei linfociti, come i geni del recettore riarrangiato per l'antigene, mentre il promotore dell'insulina può essere usato per esprimere geni a livello delle cellule β delle isole pancreatiche. Alcuni esempi dell'utilità di queste metodiche per studiare il sistema immunitario sono menzionate in molti dei capitoli di questo libro. I transgeni possono anche essere espressi sotto il controllo di promotori che rispondono a farmaci o a ormoni, come le tetracicline o gli estrogeni. In questi casi, la trascrizione del transgene può essere controllata mediante la somministrazione dell'agente induttore.

Un metodo estremamente efficace per sviluppare modelli animali di alterazioni a carico di un singolo gene, oltre che essere il modo più completo per stabilire la funzione di un gene *in vivo*, è la creazione di topi knockout attraverso le mutazioni o la delezione genica mirata. Questa tecnica si basa sul fenomeno della ricombinazione omologa. Se un gene esogeno viene inserito in una cellula, per esempio, tramite elettroporazione, esso può essere integrato casualmente nel genoma della cellula; tuttavia, se il gene contiene sequenze omologhe per un gene endogeno, questo si ricombinerà preferenzialmente con le sequenze endogene, sostituendole. Per selezionare le cellule che sono state sottoposte a ricombinazione omologa, viene utilizzata una strategia farmacologica selettiva. Il frammento di DNA omologo da inserire nella cellula viene posto in un vettore che contiene un gene per la resistenza alla neomicina e un gene per la timidinachinasi virale (*tk*) (Fig. A-6, *A*). Questo vettore viene costruito in maniera tale che il gene della resistenza alla neomicina sia sempre inserito nel DNA cromosomico, mentre il gene *tk* vada perso ogni volta che ha luogo una ricombinazione omologa invece di una inserzione random. Dopo l'introduzione del vettore le cellule vengono fatte crescere in presenza di neomicina e di ganciclovir, un farmaco che viene metabolizzato dalla timidina chinasi per generare un prodotto letale. Le cellule in cui il gene ha subito un'integrazione casuale

sono resistenti alla neomicina ma vengono uccise dal ganciclovir, mentre quelle in cui si è verificata una ricombinazione omologa sono resistenti a entrambi i farmaci, poiché il gene *tk* non si è integrato. Questa selezione positiva-negativa assicura che il gene inserito nelle cellule sopravvissute sia andato incontro a una ricombinazione omologa con le sequenze endogene. La presenza del DNA estraneo all'interno di un gene endogeno generalmente distrugge le sequenze codificanti endogene e abolisce l'espressione o la funzione di tale gene. Inoltre, i vettori possono essere costruiti in modo tale che la ricombinazione omologa possa portare alla delezione di uno o più esoni del gene endogeno.

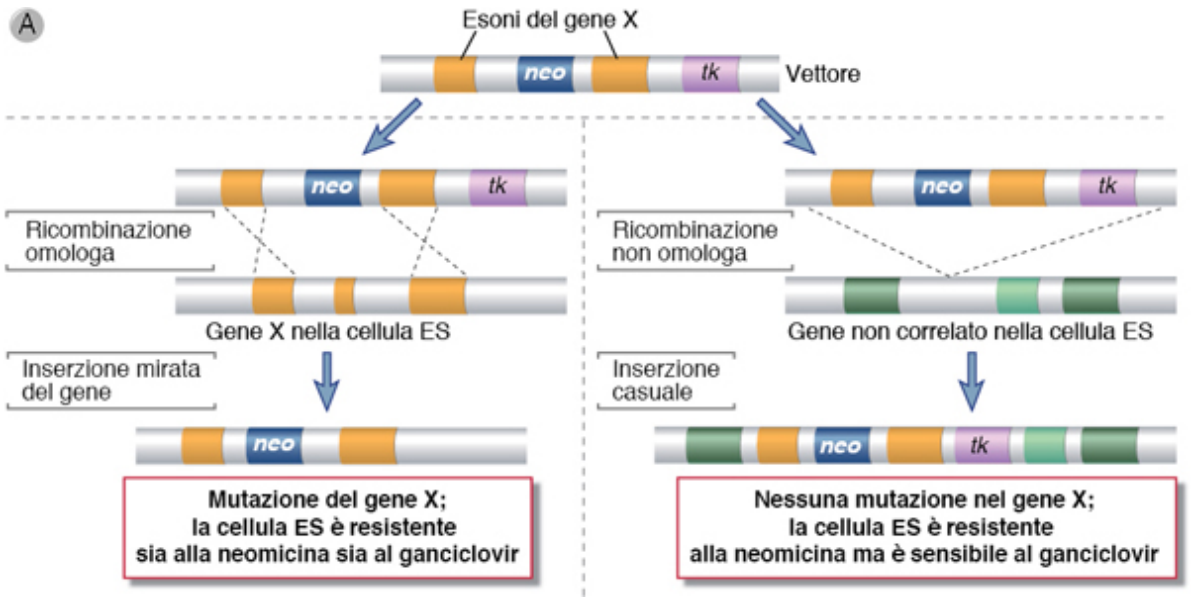


FIGURA A-6 Generazione di un knockout genetico. A. La distruzione di un gene X in una cellula embrionale staminale (ES) viene ottenuta per ricombinazione omologa. Una popolazione di cellule ES viene transfettata con un vettore di interesse che contiene sequenze omologhe ai due esoni del gene X, che sono fiancheggiate dal gene per la resistenza alla neomicina (*neo*). Il gene *neo* sostituisce o distrugge uno degli esoni del gene X per ricombinazione omologa. Il gene della timidina-chinasi (*tk*), presente nel vettore, sarà inserito nel genoma solo se si verifica una ricombinazione accidentale non omologa.

Per generare un topo con un'alterazione permanente di un determinato gene, viene prima usato un vettore che distrugge il gene nella linea cellulare staminale embrionale murina (*Embryonic Stem*, ES). Le cellule ES sono cellule pluripotenti derivate da embrioni murini che possono essere propagate e indotte a differenziare in coltura o incorporate in una blastocisti di topo, la quale può essere impiantata in una femmina pseudogravida. Un

dato importante è che la progenie delle cellule ES si sviluppa normalmente nei tessuti maturi in cui esprimerà i geni esogeni che sono stati transfettati. Quindi, il vettore progettato per alterare un particolare gene viene inserito nelle cellule ES e le colonie in cui si è verificata la ricombinazione omologa (su un cromosoma) vengono selezionate come descritto in precedenza (vedi Fig. A-6, *B*). L'avvenuta ricombinazione viene verificata con l'analisi del DNA tramite tecniche come il Southern blot o la reazione a catena della polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). Le cellule ES selezionate vengono iniettate nella blastocisti, che verrà poi impiantata in femmine pseudogravide. I topi che si sviluppano saranno chimerici per l'alterazione o la mutazione, e cioè alcuni tessuti saranno derivati dalle cellule ES e altri dal resto della normale blastocisti. Le cellule germinative sono generalmente chimeriche, ma poiché queste cellule sono aploidi, solo alcune conterranno la copia del cromosoma con il gene alterato (mutato). Se i topi chimerici vengono accoppiati con quelli normali (*wild-type*) e i loro spermatozoi od ovuli contenenti il cromosoma con la mutazione si uniscono con quelli del partner *wild-type*, tutte le cellule della prole saranno eterozigoti per la mutazione (è la cosiddetta trasmissione germinativa). Questi topi eterozigoti possono essere accoppiati tra di loro originando animali omozigoti per la mutazione con una frequenza che si può prevedere con una semplice segregazione mendeliana. I topi knockout così ottenuti non esprimono il gene di interesse (cioè il gene oggetto dello studio).

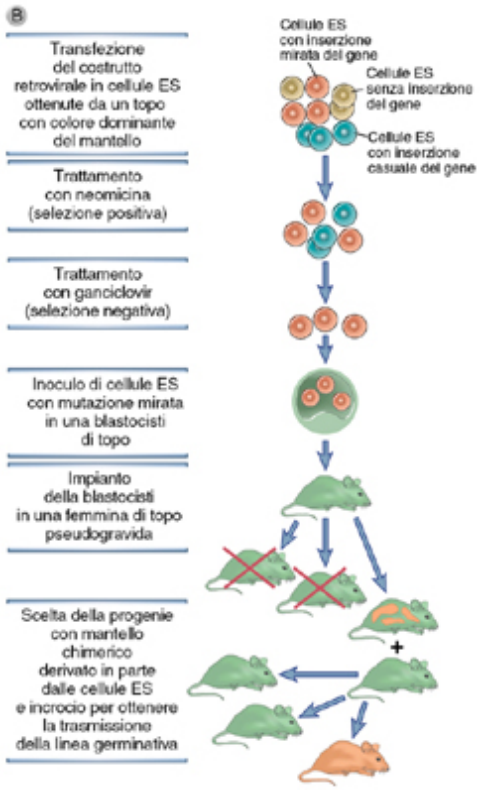


FIGURA A-6 (*Seguito*) **B.** Le cellule ES che sono transfettate con il vettore di interesse sono selezionate con neomicina e ganciclovir in modo che sopravvivano solo le cellule che hanno subito la ricombinazione omologa. Queste cellule vengono quindi iniettate in una blastocisti, che è successivamente impiantata nell'utero di una femmina pseudogravida. Si svilupperà un topo chimerico in cui alcuni tessuti sono derivati dalle cellule ES che portano la mutazione mirata nel gene X. Questi topi chimerici sono caratterizzati da un mantello di colore misto, che comprende il colore del ceppo del topo da cui sono derivate le cellule ES e il colore del ceppo del topo da cui è derivata la blastocisti. Se la mutazione è presente nelle cellule della linea germinativa, ulteriori incroci permetteranno di ottenere animali che esprimono in modo omogeneo la mutazione.

La ricombinazione omologa può anche essere usata per sostituire una normale sequenza genica con una versione modificata dello stesso gene (o di un altro gene), così da creare un ceppo murino knockin. I topi knockin possono essere utilizzati per valutare le conseguenze biologiche o la mutazione di una singola base, per esempio, confrontandola con la delezione del gene. L'approccio knockin può essere usato, in linea di principio, per sostituire un gene difettivo con uno normale. In alcune circostanze, un gene differente può essere inserito in un sito predefinito nel genoma con la strategia knockin, piuttosto che in un posto casuale come in un topo transgenico convenzionale. L'approccio knockin è usato anche quando si vuole valutare la regolazione da parte di sequenze endogene di DNA

sull’espressione di un transgene, come particolari promotori o regioni enhancer. In questo caso, il vettore utilizzato contiene un gene esogeno che codifica un prodotto desiderato nonché sequenze omologhe a un gene endogeno necessarie per dirigere il sito di ricombinazione.

Questi approcci si sono dimostrati di grande utilità nella ricerca immunologica ma è opportuno considerare anche alcuni dei loro limiti. Anzitutto, la mutazione di un gene durante lo sviluppo può essere compensata da un’alterata espressione di altri prodotti genici, e quindi la funzione dei geni di interesse può risultare “mascherata”. In secondo luogo, in un topo knockout convenzionale, l’importanza di un gene espresso in un unico tessuto o solo in una fase dello sviluppo può non essere di facile valutazione. In terzo luogo, il gene di selezione funzionale che codifica per la resistenza alla neomicina può produrre risultati imprevedibili sul fenotipo dell’animale. Un importante affinamento della tecnologia che potrebbe permettere di superare molti di questi inconvenienti è l’approccio del targeting “condizionale” Questa strategia si avvantaggia dal sistema di ricombinazione derivato dal batteriofago Cre/*loxP*. L’enzima Cre è una DNA-ricombinasi che riconosce un motivo di 34 paia di basi chiamato ***loxP*** e media la delezione di segmenti genici fiancheggiati da due siti *loxP* nello stesso orientamento. Per generare topi con queste tecnologie, vengono costruiti vettori contenenti un sito *loxP* fiancheggiante il gene della resistenza alla neomicina a un’estremità e un secondo sito *loxP* fiancheggiante la sequenza omologa di interesse all’altra estremità. Questi vettori vengono transfettati in cellule ES e utilizzati per generare topi portatori dei geni di interesse funzionali ma fiancheggiati dalla sequenza *loxP* (*floxed*). Un secondo ceppo di topi che porta il transgene *cre* viene quindi accoppiato a questi topi: nella progenie, l’espressione della ricombinasi Cre produrrà la delezione del gene bersaglio, incluso il gene per la resistenza alla neomicina. È importante sottolineare che l’espressione del gene *cre*, e quindi la delezione del gene di interesse, può essere limitata ad alcuni tessuti o a certe fasi dello sviluppo mediante l’uso di costrutti transgenici *cre* dotati di diversi promotori. Per esempio, la delezione selettiva di un determinato gene nei macrofagi e nei granulociti può essere realizzata usando un topo transgenico *cre* in cui l’espressione del transgene è guidata dal promotore dell’enzima lisozima, oppure si può ottenere la perdita selettiva di un gene nei linfociti T regolatori utilizzando un topo transgenico

che esprime la ricombinasi *cre* sotto il controllo del promotore del fattore di trascrizione FoxP3. In alternativa, può essere usato un promotore inducibile dagli steroidi in modo che l'espressione della ricombinasi Cre e la susseguente rimozione del gene avvengano solo dopo che i topi hanno ricevuto la somministrazione del farmaco. Per creare mutanti condizionali sono state ideate molte altre varianti di questa tecnologia. La tecnologia Cre/*loxP* può anche essere utilizzata per generare topi knockin. In questo caso, i siti *loxP* sono posti nel vettore che fiancheggia il gene per la resistenza alla neomicina e le sequenze omologhe, ma non le sequenze geniche che si vogliono sostituire (knockin). Quindi, dopo la delezione indotta dalla ricombinazione operata dal gene *cre*, il gene esogeno resta nel genoma nella sede di interesse.

La strategia utilizzata per la generazione dei topi knockin, ha trovato applicazione anche per la generazione di topi denominati "reporter" in cui in cellule esprimenti una particolare proteina, viene espressa una molecola fluorescente contemporaneamente alla proteina nativa di interesse. Questo risultato viene raggiunto sostituendo il gene nativo con un transgene che codifica sia per la molecola "reporter" fluorescente che per la proteina nativa, entrambe espresse sotto il controllo del promotore e dell'enhancer della proteina nativa. Grazie a questo approccio sono stati generati topi "reporter" che consentono di visualizzare *in vivo* particolari sottotipi di cellule immunitarie, come per esempio ceppi murini in cui le cellule esprimenti IL-17 esprimono anche una proteina fluorescente che ne permette una facile identificazione per esempio utilizzando microscopia a fluorescenza intravitale. Le cellule che esprimono i geni "reporter" possono anche essere isolate e sottoposte a studi funzionali *ex vivo*, anche qualora il gene nativo, rilevato tramite l'espressione della molecola "reporter", sia un fattore di trascrizione nucleare, la cui espressione sarebbe altrimenti individuabile solo utilizzando metodi che prevedono la lisi e la morte cellulare. Per esempio, linfociti T regolatori possono essere facilmente isolati mediante FACS-sorting da linfonodi di un topo "reporter" che esprime una proteina fluorescente sotto il controllo del promotore del fattore di trascrizione FoxP3.

Un approccio innovativo per la generazione delle mutazioni nelle linee cellulari, così come nelle cellule ES, si basa sull'utilizzo di un sistema modificato di difesa antibatterica contro il DNA estraneo chiamato sistema

CRISPS (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) Cas9 (*CRISPR Associated nuclease 9*). In questo approccio di manipolazione genetica, un RNA guida si ibrida con una sequenza di DNA bersaglio e consente alla nucleasi Cas9 di generare una rottura mirata al doppio filamento.

Mentre tale rottura può causare la delezione di un gene, la contemporanea cotransfezione di un plasmide con una versione mutata della sequenza bersaglio consente una ricombinazione omologa efficiente e la creazione di una mutazione knockin prefissata. Questo è l'approccio più rapido, oggi a disposizione, per la generazione di mutazioni knockout o knockin nelle linee cellulari o nelle linee germinali degli animali da esperimento.

METODI PER LO STUDIO DELLE RISPOSTE DEI LINFOCITI T

Le nostre conoscenze relative agli eventi cellulari successivi all'attivazione dei linfociti T derivano da molteplici tecniche sperimentali che permettono di studiare l'attivazione e le risposte funzionali di queste cellule. Studi *in vitro* hanno permesso di comprendere gli eventi intracellulari che sono attivati in seguito alla stimolazione da parte dall'antigene. Negli ultimi anni, sono state sviluppate tecniche che permettono di misurare *in vivo* la proliferazione dei linfociti T, l'espressione di citochine e la loro redistribuzione anatomica in seguito all'attivazione antigenica. I nuovi approcci sperimentali sono stati particolarmente utili per lo studio dei processi di attivazione dei linfociti T naïve e per la comprensione della localizzazione dei linfociti T della memoria nelle fasi successive alla loro risposta.

Attivazione policlonale dei linfociti T

Gli attivatori policlonali dei linfociti T si legano alla maggior parte o a tutti i recettori per l'antigene (*T Cells Receptors*), TCR indipendentemente dalla loro specificità e attivano i linfociti T in modo simile al complesso MHC-peptide espresso dalle cellule che presentano l'antigene (*Antigen Presenting Cells*, APC). Gli attivatori policlonali sono utilizzati per lo più *in vitro* per

attivare cellule isolate da sangue periferico o da tessuti linfoidi. Gli attivatori policlonali sono inoltre utilizzati per attivare linfociti T di cui non è nota la specificità antigenica. Questi possono evocare una risposta misurabile da popolazioni miste di linfociti T naïve, indipendentemente dal fatto che la frequenza delle cellule specifiche per uno stesso antigene sia molto bassa. Le proteine polimeriche di origine vegetale, dette *lectine*, come la concanavallina-A e la fitoemagglutinina, sono solo uno dei tanti tipi di attivatori policlonali. Queste lectine si legano in modo specifico ad alcuni residui glucidici delle glicoproteine presenti sulla superficie dei linfociti T, inclusi TCR e CD3, provocandone l'attivazione. Un modo alternativo per indurre l'attivazione policlonale dei linfociti T si basa sull'utilizzo di anticorpi specifici per epitopi costanti del TCR o delle proteine CD3. Questi anticorpi sono più efficaci se vengono utilizzati immobilizzati su superfici solide, come le biglie, oppure raggruppati mediante l'utilizzo di anticorpi secondari. Siccome gli attivatori policlonali solubili non forniscono il secondo segnale che viene normalmente dato dalle APC, spesso vengono utilizzati insieme ad anticorpi che stimolano le molecole costimolatorie come anti-CD28 o anti-CD2. I superantigeni, un altro tipo di stimolo policlonale, legano e attivano tutte le cellule T che esprimono un determinato tipo di catena β del TCR (vedi Fig. 16-2). I linfociti T di una qualsiasi specificità per l'antigene possono essere attivati anche con reagenti chimici, come l'associazione di estere del forbolo e del calcio ionoforo ionomicina, che mimano i segnali normalmente generati dall'attivazione del complesso del TCR.

Attivazione mediante antigene di popolazioni policlonali di linfociti T

Popolazioni policlonali di linfociti T con un'aumentata frequenza di cellule specifiche per un particolare antigene possono essere ottenute dal sangue o dai tessuti linfoidi di un individuo in seguito a immunizzazione. L'immunizzazione serve a espandere il numero di linfociti T antigene-specifici; queste possono essere successivamente stimolate *in vitro* in presenza dell'antigene stesso e di APC che esprimano lo stesso aplotipo dei linfociti. Questo approccio può essere utilizzato per studiare la risposta a un determinato antigene in una popolazione di cellule che esprimono diversi

TCR e che sono state precedentemente attivate con l'antigene. Questo metodo non permette tuttavia lo studio dei linfociti T naïve.

Attivazione indotta dall'antigene di linfociti T specifici

Lo studio di popolazioni monoclonali che esprimono un identico TCR si è rivelato utile per analisi di tipo funzionale, biochimico e molecolare. La limitazione delle popolazioni monoclonali è dovuta al fatto che esse vengono tenute in coltura a lungo termine, in modo simile a una linea cellulare, e possono nel tempo divergere dai linfociti T normalmente presenti *in vivo*. Negli studi di immunologia sperimentale vengono spesso usati cloni cellulari specifici per un determinato antigene. Questi cloni si ottengono isolando i linfociti T da individui immunizzati, così come descritto per gli attivatori policlonali, e in seguito stimolandoli ripetutamente *in vitro* con l'antigene usato per l'immunizzazione in presenza di APC dotate di un corredo di molecole MHC simile a quello del donatore dei linfociti. Le cellule vengono poi clonate in mezzi di coltura semisolidi, o in mezzi di coltura liquidi per "diluizione limite", in modo da isolare i singoli linfociti T responsivi all'antigene. Queste popolazioni permettono di valutare facilmente le risposte antigene-specifiche poiché tutte le cellule in un certo clone hanno gli stessi recettori e sono state selezionate per crescere in risposta a uno stesso complesso MHC-peptide. Questa tecnica ha permesso di ottenere cloni di linfociti T sia helper sia citotossici nell'uomo e nel topo. Altre popolazioni di linfociti T monoclonali sono gli ibridomi T, che vengono ottenuti *in vitro* in seguito a selezione delle cellule T tumorali prelevate da animali o pazienti affetti da leucemie a cellule T o linfomi, in modo del tutto simile a quanto effettuato per la produzione degli ibridomi di cellule B (vedi Fig. 5-9). Nonostante alcune linee cellulari tumorali esprimano un TCR funzionale, la loro specificità antigenica non è nota e le cellule vengono spesso stimolate con attivatori policlonali per scopi sperimentali. Le cellule Jurkat sono una linea cellulare derivata da una leucemia umana a cellule T e rappresentano un esempio di linea tumorale ampiamente usata per lo studio della trasduzione del segnale.

I topi con un TCR transgenico costituiscono una sorgente di linfociti T normali che possiedono la stessa specificità per l'antigene e sono ampiamente usati per studi *in vitro* e *in vivo*. Se i geni per le catene α e β di

un singolo TCR di specificità nota sono espressi come transgene nel topo, la maggioranza deilinfociti T maturi esprimerà quel TCR. Se il transgene TCR è incrociato con un topo deficiente per *RAG-1* o *RAG-2*, che non ha espressione di TCR endogeni, il 100% delle cellule T esprimerà soltanto il TCR transgenico. I linfociti con TCR transgenico possono essere attivati *in vitro* o *in vivo* con un singolo peptide antigenico e possono essere identificati con anticorpi specifici per il TCR transgenico. Uno dei vantaggi peculiari dei topi con TCR transgenico è quello di permettere l'isolamento di un numero sufficiente di cellule naïve con specificità definita, tale da consentire lo studio di risposte immunitarie primarie. Questa caratteristica ha permesso di studiare *in vivo* le condizioni necessarie per la differenziazione dei linfociti T naïve in sottopopolazioni funzionali come T_H1 e T_H2 in risposta a un dato antigene (vedi Cap. 9). Per questi esperimenti, i linfociti T naïve da topi con TCR transgenico vengono iniettate in animali singenici normali dove migrano nei tessuti linfoidi. Il topo ricevente viene quindi esposto all'antigene e, attraverso l'uso di anticorpi che riconoscono le cellule con TCR transgenico, è possibile seguire la loro espansione e differenziazione *in vivo*, oltre che isolarle per analizzare la loro risposta secondaria a una seconda esposizione all'antigene *ex vivo*.

Metodi per enumerare e studiare funzionalmente la risposta T

I saggi di proliferazione dei linfociti T, come quelli di altre cellule, vengono condotti *in vitro* attraverso la misurazione della quantità di timidina marcata (con ^3H) incorporata nel DNA. L'incorporazione di timidina fornisce una misura quantitativa del grado di sintesi del DNA, che è generalmente direttamente proporzionale al grado di divisione cellulare. La proliferazione cellulare *in vivo* può essere misurata iniettando l'analogo della timidina, la bromodesossiuridina (BrdU), e marcando le cellule con anticorpi anti-BrdU, per identificare ed enumerare i nuclei che hanno incorporato la BrdU durante la replicazione del DNA.

Per studiare la proliferazione di linfociti T *in vivo* possono anche essere utilizzati marcatori fluorescenti. I linfociti T vengono marcati con esteri lipofilici chimicamente reattivi e poi trasferite negli animali da esperimento. I coloranti entrano nelle cellule, formano legami covalenti con le proteine citoplasmatiche che ne impediscono la fuoriuscita. Uno dei coloranti

comunemente utilizzato è la 5,6-carbossifluorescina diacetato succinimidil estere (CFSE), che può essere visualizzato attraverso tecniche standard di citofluorimetria. A ogni divisione cellulare, il contenuto del colorante all'interno della cellula si dimezza permettendo di determinare il numero di divisioni cellulari cui sono andate incontro, *in vivo*, le cellule presenti nei tessuti linfoidi del topo ricevente.

I tetrameri peptide-MHC sono utilizzati per enumerare i linfociti T con una data specificità antigenica una volta che sono stati isolati dal sangue o dai tessuti linfoidi di animali da esperimento o umani. Questi tetrameri contengono quattro complessi peptide-MHC simili a quelli che la cellula T riconoscerebbe normalmente sulla superficie delle APC. Il tetramero viene costruito attraverso la tecnologia del DNA ricombinante, legando a una molecola MHC di classe I una piccola molecola chiamata biotina. La biotina lega con alta affinità una proteina chiamata avidina e ogni avidina lega quattro molecole di biotina. Di conseguenza, l'avidina costituisce un substrato che assembla quattro molecole MHC legate alla biotina. Le molecole MHC vengono caricate e stabilizzate con il peptide di interesse e la molecola di avidina viene marcata con un fluorocromo, come per esempio la FITC. Il tetramero così assemblato si lega ai linfociti T specifici con un'avidità sufficientemente alta da legare anche le cellule in sospensione. Questo è il solo approccio sperimentale che può essere utilizzato per identificare linfociti T antigene-specifici nell'uomo. Per esempio, è possibile identificare ed enumerare linfociti T circolanti ristretti per HLA-2A, specifici per un certo peptide HIV, marcando le cellule del sangue con un tetramero formato dalla molecola HLA-A2 caricata con quel particolare peptide. La stessa tecnica si utilizza per enumerare e isolare i linfociti T specifici per antigeni self in individui normali e in pazienti con patologie autoimmuni. I tetrameri peptide-MHC che legano un particolare TCR transgenico possono anche essere utilizzati per quantificare i linfociti T transgenici in diversi tessuti in seguito a trasferimento adottivo e stimolazione antigenica. Questa tecnica viene attualmente utilizzata con molecole MHC di classe I; nelle molecole MHC di classe I, infatti, solo un polipeptide è polimorfo e questo permette di ottenere *in vitro* molecole stabili. Questo risultato è più difficile da ottenere per molecole MHC di classe II, poiché in questo caso entrambe le catene sono polimorfe e

indispensabili per un corretto assemblaggio; tuttavia, questo problema è attualmente in fase di risoluzione.

I saggi di secrezione di citochine possono essere utilizzati per quantificare i linfociti T secernenti citochine all'interno di tessuti linfoidi. I metodi più comunemente utilizzati sono la marcatura citoplasmatica di citochine e il saggio enzimatico immunoassorbente a singola cellula (*single-cell Enzyme-Linked Immunosorbent assays*, ELISpot). In questi tipi di saggi, l'attivazione indotta dall'antigene e il differenziamento dei linfociti T avvengono *in vivo* e successivamente le cellule vengono isolate e testate per l'espressione di citochine *in vitro*. La marcatura citoplasmatica di citochine richiede la permeabilizzazione delle cellule in modo che gli anticorpi specifici per una particolare citochina e coniugati a fluorocromi possano penetrare nella cellula; le cellule sono poi analizzate mediante citofluorimetria a flusso. L'espressione di citochine da parte di linfociti T specifici per un particolare antigene può essere determinata marcando i linfociti T con tetrameri-MHC-peptide o, nel caso di linfociti transgenici per il TCR, con anticorpi specifici per il TCR transgenico. Utilizzando una combinazione di CFSE e anticorpi anticitochina, è possibile esaminare la relazione tra divisione cellulare ed espressione di citochine. Nel saggio ELISpot, linfociti T freschi, isolati dal sangue o da organi linfoidi, vengono coltivati in pozzetti di plastica rivestiti con anticorpi specifici per una particolare citochina. Appena le citochine vengono secrete da un singolo linfocita, esse si legano agli anticorpi in aree (*spot*) separate, corrispondenti alla posizione dei singoli linfociti T. Gli spot vengono visualizzati aggiungendo un anticorpo secondario coniugato a un enzima, come in un test ELISA standard (vedi sopra): la conta del numero degli spot permette di determinare il numero di linfociti T in grado di produrre citochine.

METODI PER LO STUDIO DELLE RISPOSTE DEI LINFOCITI B

Attivazione policlonale delle cellule B

Lo studio dell'attivazione dei linfociti B normali in risposta a un dato antigene è difficile da studiare a causa del numero particolarmente esiguo di

linfociti specifici per un dato antigene. Un approccio che permette di aggirare questo problema si basa sull'utilizzo di anticorpi anti-Ig, assumendo che questi anticorpi mimino l'azione dell'antigene, pur legandosi alle regioni costanti delle Ig di membrana su tutti i linfociti B invece che alle regioni ipervariabili delle Ig specifiche, come farebbe un antigene. In condizioni controllate questa assunzione è in genere corretta, indicando che gli anticorpi anti-Ig rappresentano una valida alternativa all'utilizzo dell'antigene. Gli anticorpi anti-Ig sono quindi frequentemente usati come attivatori policlonali dei linfociti B, così come gli anticorpi anti-CD3 vengono utilizzati come attivatori policlonali dei linfociti T.

Attivazione indotta dall'antigene dei linfociti B specifici

Per esaminare l'effetto del legame dell'antigene alle cellule B, i ricercatori hanno tentato di isolare i linfociti B antigene-specifici da popolazioni di linfociti normali, o di produrre linee cellulari B clonate, specifiche per un antigene definito. Questi tentativi hanno avuto scarso successo, tuttavia, sono stati generati topi transgenici in cui virtualmente tutti i linfociti B esprimono un'Ig transgenica di specificità nota e la maggior parte deilinfociti B risponde allo stesso antigene. Un approccio se possibile ancora più sofisticato è stato quello di generare topi knockin per il recettore per l'antigene, in cui i geni delle catene Ig H ed L riarrangiate sono stati ricombinati in modo omozigote nei loci endogeni. Questi animali knockin sono risultati particolarmente utili nello studio del processo di maturazione dell'affinità delle Ig.

Analisi della proliferazione dei linfociti B e della produzione anticorpale

Molte delle nostre conoscenze sull'attivazione dei linfociti B è basata su esperimenti *in vitro* e sull'utilizzo di diversi stimoli che permettono di valutare il processo di proliferazione e differenziazione cellulare. Gli stessi test possono essere effettuati su cellule B isolate da topi esposti a diversi antigeni o con popolazioni di cellule B che esprimono recettori transgenici per l'antigene.

La proliferazione dei linfociti B viene misurata *in vitro* attraverso la marcatura con CFSE, l'incorporazione di timidina marcata con ^{3}H, e *in vivo*

mediante marcatura con BrdU, come precedentemente descritto per la proliferazione dei linfociti T.

La produzione di anticorpi si misura in due modi diversi: con test che misurano la quantità totale di immunoglobuline che si accumula nel supernatante di linfociti coltivati *in vitro* o nel siero di un individuo immunizzato; oppure con test che determinano il numero di cellule che producono Ig dotate di una particolare specificità o isotipo nell'ambito di una popolazione *in vitro*. La metodica più accurata, quantitativa e ampiamente utilizzata per misurare la quantità totale di immunoglobuline in un supernatante o in un campione di siero, è il test ELISA: legando l'antigene a un supporto solido è possibile usare questo test per quantificare gli anticorpi specifici per quell'antigene in un dato campione. Inoltre, utilizzando anticorpi che distinguono le diverse catene pesanti e leggere delle diverse classi di Ig è possibile anche valutare i differenti isotipi anticorpali. Altre tecniche per la misurazione dei livelli di anticorpi includono l'emoagglutinazione di anticorpi antieritrociti e la lisi mediata dal complemento da parte di anticorpi specifici per un dato tipo cellulare. Entrambi i test sono basati sulla dimostrazione che, se la quantità di antigene (per esempio cellule) è costante, la concentrazione di anticorpo determina la quantità di anticorpo legato alle cellule e questo si traduce nel grado di agglutinazione delle cellule o nei successivi legame del complemento e lisi cellulare. I risultati di questi test sono espressi come titolo anticorpale, ossia la diluizione del campione a cui si osserva metà dell'effetto massimo, oppure la diluizione a cui è raggiunta la saturazione del test.

Un test basato su una singola cellula per la secrezione di anticorpi è l'ELISpot. In questa metodica le cellule che producono anticorpi vengono aggiunte all'antigene presente su un substrato semisolido sul fondo di una piastra; gli anticorpi secreti si legano quindi all'antigene e vengono rilevati con un anticorpo anti-Ig come nel test ELISA. Ciascuno spot rappresenta il sito in cui è presente una cellula secernente anticorpi. I test condotti su una singola cellula permettono di valutare il numero di cellule che producono anticorpi ma non possono quantificare accuratamente la quantità di Ig secrete da ogni singola cellula o dall'intera popolazione. I test ELISA ed ELISpot possono essere adattati per poter misurare l'affinità degli anticorpi attraverso l'uso di antigeni che differiscono nel numero di apteni. In questo modo la maturazione per affinità può essere rilevata testando il siero o

direttamente le cellule B raccolte in tempi differenti nel corso della risposta immunitaria.